

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección Departamental de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Papel de caveolina-1 en la transducción de señales: regulación del ciclo celular dependiente de integrinas y generación de un nuevo modelo murino de expresión de caveolina-1 no fosforilable (CAVly f)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta C. Guadamillas Mora

Directores

Miguel Ángel del Pozo
Ana Cerezo

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DE CAVEOLINA-1 EN LA TRANSDUCCIÓN
DE SEÑALES: REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR
DEPENDIENTE DE INTEGRINAS Y GENERACIÓN DE
UN NUEVO MODELO MURINO DE EXPRESIÓN DE
CAVEOLINA-1 NO FOSFORILABLE (CAV1^{Y14F})**

TESIS DOCTORAL
2012

MARTA C. GUADAMILLAS MORA

Dirigida por:
Dr. Miguel Ángel del Pozo
Dra. Ana Cerezo



CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS

El **Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso** y la **Dra. Ana Cerezo Montemayor** **CERTIFICAN** que la doctoranda **Marta C. Guadamillas Mora** ha desarrollado y concluido su trabajo de Tesis Doctoral titulado “PAPEL DE CAVEOLINA-1 EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES: REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR DEPENDIENTE DE INTEGRINAS Y GENERACIÓN DE UN NUEVO MODELO MURINO DE EXPRESIÓN DE CAVEOLINA-1 NO FOSFORILABLE (CAV1^{Y14F})” bajo su supervisión, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, con la financiación de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

En Madrid, a 5 de Diciembre de 2011

Dr. Miguel Ángel del Pozo Barriuso
Jefe de Grupo (Investigador Senior II)
Laboratorio de Señalización por Integrinas
Departamento de Biología Vascular e Inflamación
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

Dra. Ana Cerezo Montemayor
Investigadora
Laboratorio de Señalización por Integrinas
Departamento de Biología Vascular e Inflamación
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

A Jesús y Lola, mis padres
por creer que se puede.

A Julio, Alba y Alejandro,
porque, con esfuerzo, se puede.

A Jose,
por ayudar a que se pueda.

AGRADECIMIENTOS

Cerca ya del final de esta etapa, quisiera aprovechar la oportunidad de dar las gracias a todas aquellas personas que me han acompañado y apoyado, de una forma u otra, durante estos años de Tesis. Todo este esfuerzo ha merecido la pena, por todo lo que he conseguido aprender, no solo en el ámbito profesional y científico, sino también a nivel humano, ayudándome a crecer y madurar como investigadora y, sobre todo, como la persona que ahora soy.

En primer lugar, quiero agradecer a Miguel Ángel del Pozo la confianza que ha depositado en mí desde el principio. Gracias por ofrecirme la oportunidad de realizar mi Tesis en este laboratorio, en un centro de investigación de la categoría del CNIC, donde he podido desarrollarme y crecer como investigadora. Gracias por animarme a ampliar horizontes, y a realizar una estancia breve fuera del laboratorio. Gracias por seguir creyendo en mis aptitudes y ayudarme a madurar como científica.

Agradezco a Ana Cerezo, mi otra directora, por todo lo que me ha enseñado, y por el apoyo que me ha dado durante todos estos años, sin el cual esta Tesis habría costado bastante más. Ana, ha sido un verdadero placer trabajar contigo. Gracias por tu generosidad, por hacer que todo parezca más fácil, por tu paciencia, por tus consejos, por tus preocupaciones. Gracias por escucharme y tenerme en cuenta. Gracias por los ánimos y la serenidad que me has sabido transmitir; gracias por tu amistad.

A Alicia García Arroyo y María Montoya les agradezco la oportunidad de colaborar en otros proyectos diferentes, lo cual siempre resulta estimulante y enriquecedor.

Agradezco a todas aquellas personas, que con su discusión en seminarios y otros foros, han ayudado a madurar los proyectos científicos en los que me he embarcado. Quisiera agradecer a la gente del CNIO que, a través de Ana, aportaron buenas ideas y consejos, sobre todo para la generación del ratón.

Por supuesto, quiero dar las gracias a toda la gente de mi grupo y a los “vecinos” (tanto a los que están como a los que ya se fueron) por todo lo que me han aportado durante estos años. Gracias, como no, por vuestro apoyo científico, por vuestras ideas y consejos, y por echarme una mano siempre que os lo he pedido. Pero sobre todo, gracias por todos los momentos que hemos compartido, por todos esos desayunos y meriendas, por esos “tienes un momento...”; por saber escucharme, por la paciencia y comprensión; por vuestra amistad.

Gracias a Íñigo, Ara y Miguel que fuisteis unos grandes compañeros, intentando siempre hacer del grupo una pña. Gracias a Inma y Olivia, ejemplo de que el esfuerzo da sus frutos. Gracias a Asier, Teijo y Jacky por esos momentos de discusión científica. Gracias a Raffaele por su interés y ayuda. Gracias a Susana, por su fuerza, sus consejos y su apoyo. Gracias a Aleix, por este año de ánimos. Gracias a Rober y Ana Lázaro, por su frescura. Gracias a las técnicas: Dácil y Sara, gracias por vuestra disposición y por tener siempre preparada una sonrisa, da gusto trabajar con vosotras; Tere, gracias por tu ayuda estos últimos meses con los ratoncitos y demás, pero sobre todo gracias, nena, por hacerme reír cuando más lo he necesitado. Por supuesto, gracias de nuevo a Ana, además, por ser una gran compañera,... ¡y por los phoskitos!

A la gente del grupo de Alicia: Vane, Ángela, Pilar, Rubén, Aga, Mara, Cristina, gracias también a vosotros, os he sentido como mis compañeros. Y sobre todo gracias a Vicki: niña, todo llega, vamos a quedarnos con lo bueno, que también es mucho. Gracias por ser un apoyo en los comienzos de esta aventura, por tus confidencias, por toda aquella complicidad y comprensión, por saber escuchar. Espero haber sido capaz durante este tiempo de pagarte con la misma moneda.

A Enara y Patricia, las “vecinas” que se fueron, muchas gracias por vuestra alegría, fue un gusto trabajar con una sonrisa enfrente.

Agradezco a Jesús Borreguero y, en especial, a Gabriela Guzmán por su ayuda en el estudio ecocardiográfico. También quiero agradecer a la gente del grupo de Juan Miguel Redondo, los otros “vecinos”, por su apoyo y colaboración, en especial a Sara Martínez, Loli y Van, por toda su ayuda y buenos consejos.

A Esther, María, Eduardo y Almudena quiero agradecerles su inestimable ayuda, cada uno en su etapa, con todo el (inevitable) papeleo. Sin vosotros estaría perdida entre tanto formulario, factura y demás, y sobre todo por atenderme siempre con una sonrisa, por muy tonta que fuera mi consulta. Gracias a Cristina Giménez por su ayuda en todas las gestiones relacionadas con la beca y la estancia (¡sin su ayuda no me hubiera podido ir a Australia!).

Por cierto, quisiera también agradecer a Rob Parton, por acogerme en su laboratorio en el IMB en Australia, y por supuesto, a todos los miembros de su grupo, que se portaron conmigo genial, en especial a Manuel Fernández-Rojo y Mark Howes. Thanks, guys, it was a pleasure!

Agradezco al personal de las unidades de Microscopía y Celómica, por la ayuda prestada y la simpatía mostrada, y a la gente del Animalario, en especial a Andrea, María José y Juanjo por su buen humor y por hacer que nuestras colonias siguieran adelante. Por supuesto, agradezco la imprescindible colaboración de las unidades de Tecnología de Células Pluripotentes y de Transgénesis, pues gracias a ellos “tenemos ratón”.

También quiero agradecer a mis amigas: Tere, Concha, Ali, Diana, Sandra, Mer, Olga, Vicki (otra vez), Elena y Elvi, por todos los ánimos y apoyo incondicional que me han dado. Gracias por tenerme paciencia, por preocuparos de mí durante esta última etapa. Pero sobre todo gracias por estar siempre ahí, por ayudarme a desconectar, por los buenos ratos que me habéis regalado, por esas escapadas, por las risas, por la confianza. Gracias por ser mis amigas.

Llegando al final, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia, por todo lo que me han dado y siguen dándome. Gracias, hermanos, por estar siempre ahí: gracias Julio, porque sé que puedo contar contigo siempre; gracias Alba por toda la alegría que eres capaz de regalar, no vayas a perderla nunca; gracias Alejandro porque con lo chico que eres me has enseñado ya muchas cosas. Gracias, padres, por ayudarme a ser quien soy, por creer en mí y por enseñarme el valor del esfuerzo y la constancia; gracias por dejarme decidir, y por vuestro apoyo incondicional, pase lo que pase; gracias por vuestra paciencia y comprensión, por vuestra preocupación y por alegraros de mis logros. Sois un ejemplo de fortaleza y honestidad, gracias por ello. Pero sobre todo gracias a todos por quererme como me queréis. Sabéis que os lleváis de mí lo mismo.

Y por último, Jose, cuánto tengo que agradecerte a ti. Gracias por tu infinita paciencia, por tu apoyo siempre, por hacer que me valore más, por levantarme el ánimo cuando me hundía. Gracias por darme todo el tiempo que necesito, por facilitarme tanto la vida. Gracias por ayudarme a no perder el norte, por hacerme ver la importancia real de las cosas, por ponerme los pies en la tierra. Gracias por tragarte todos mis “culebrones”, por escucharme con resignada paciencia, por calmar mis ánimos. Gracias por compartir conmigo todo, tuyo y mío. Gracias por hacerme reír todos los días, y obligarme a ver el lado positivo de las cosas. Gracias por contar conmigo, y darme lo mejor de ti. Gracias por todo y, sobre todo, por quererme de esta manera, es lo mejor que me puede pasar. No cambies nunca.

“La verdadera Ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

“Las Ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces frutos”

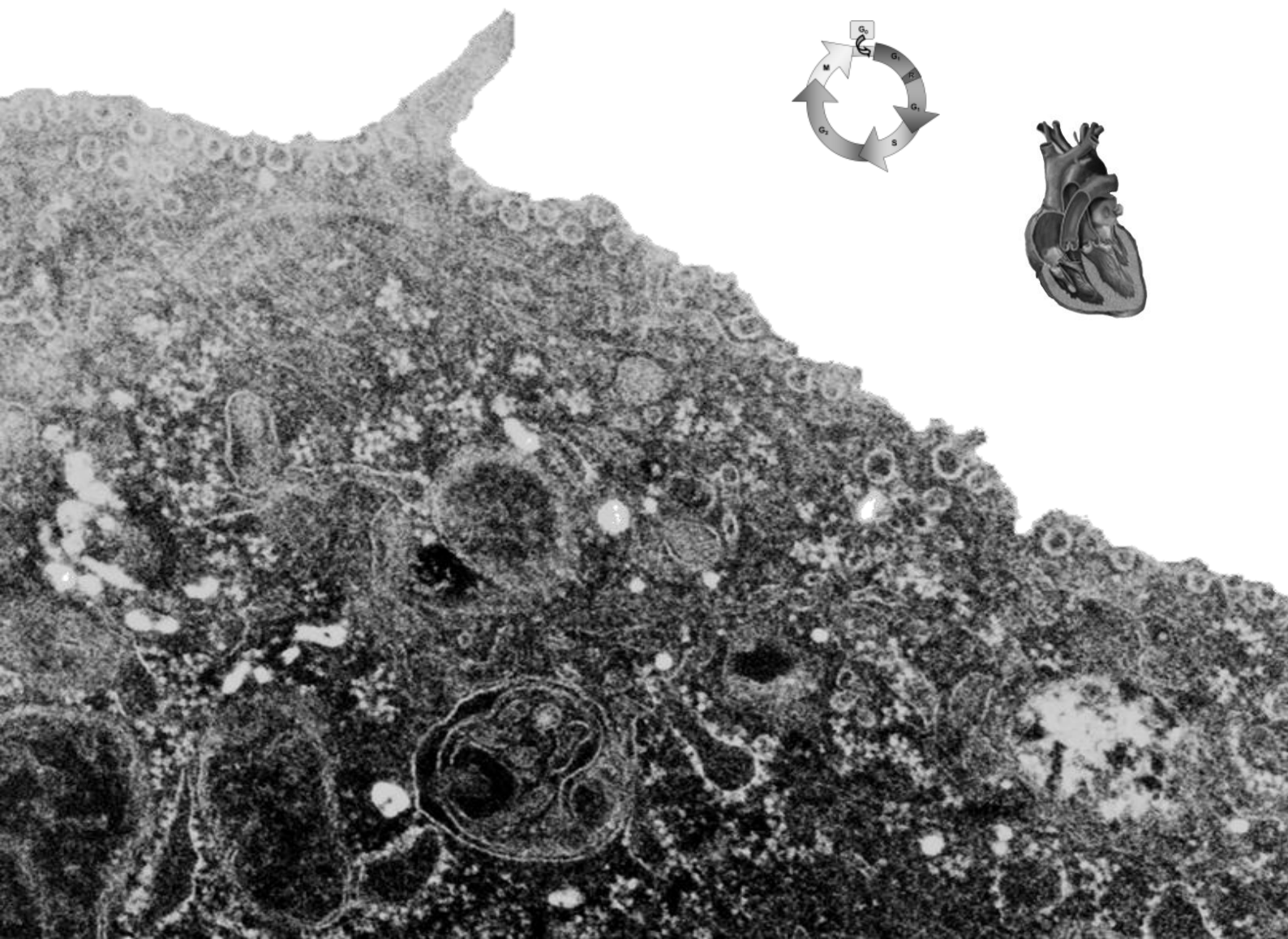
Aristóteles

INDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| 1.- INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1.- Las células y su entorno: transducción e integración de señales | 9 |
| 1.1.1.- Señalización extracelular | 9 |
| 1.1.2.- Adhesión a matriz extracelular | 9 |
| 1.1.2.1.- Integrinas | 10 |
| 1.1.3.- Regulación coordinada de la señalización por integrinas y otros receptores de superficie | 10 |
| 1.1.3.1.- Rho GTPasas como integradores de señalización | 11 |
| 1.2.- El ciclo celular | 12 |
| 1.2.1.- Fases del ciclo celular | 12 |
| 1.2.2.- Activación del ciclo celular | 13 |
| 1.2.3.- Regulación de la entrada y progresión del ciclo celular por factores externos | 15 |
| 1.2.3.1.- Rho GTPasas en la regulación del ciclo celular | 16 |
| 1.2.3.2.- PI3K en la fase G1/S del ciclo celular | 16 |
| 1.3.- Membrana plasmática y transducción de señales | 17 |
| 1.3.1.- Microdominios de membrana | 17 |
| 1.3.2.- Caveolas | 17 |
| 1.3.2.1.- Caveolinas | 19 |
| 1.3.2.2.- Cavininas | 20 |
| 1.4.- Caveolina-1 | 23 |
| 1.4.1.- Estructura de Caveolina-1 | 23 |
| 1.4.2.- Funciones biológicas de Caveolina-1: transducción de señales | 25 |
| 1.4.2.1.- Regulación por interacción directa con el dominio CSD | 26 |
| 1.4.2.2.- Regulación por internalización de CEMMs/caveolas | 27 |
| 1.4.2.3.- Y14-fosfo-Caveolina-1 (Y14-p-Cav1) | 27 |
| 1.4.3.- Modelos murinos para el estudio de las caveolinas | 28 |
| 1.4.3.1.- Ratones deficientes en Caveolina-1 | 29 |
| 1.4.3.2.- Alteraciones en el sistema cardiovascular de ratones Cav1 ^{-/-} | 31 |
| 1.4.3.2.1.- Fenotipo cardíaco | 31 |
| 1.4.3.2.2.- Otros fenotipos cardiovasculares | 33 |
| 1.4.3.3.- Papel de Cav1 en la progresión tumoral | 33 |
| 2.- OBJETIVOS | 35 |
| 3.- MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| 3.1.- Reactivos y anticuerpos | 41 |
| 3.2.- Cultivos celulares | 42 |
| 3.2.1.- Líneas celulares | 42 |
| 3.2.2.- Cultivos primarios | 43 |
| 3.2.2.1.- Extracción y cultivo de MEFs primarios | 43 |
| 3.2.2.2.- Células madre embrionarias de ratón (ES) | 44 |
| 3.3.- Ensayos de incorporación de BrdU | 44 |
| 3.4.- Ensayos de crecimiento en agar blando | 44 |
| 3.5.- Curva de crecimiento | 44 |
| 3.6.- Ensayos de formación de focos | 45 |
| 3.7.- Análisis de la apoptosis y ciclo celular por citometría de flujo | 45 |
| 3.8.- Inhibición farmacológica | 45 |
| 3.9.- Plásmidos de expresión | 45 |
| 3.10.- Transfecciones transitorias | 46 |
| 3.11.- Infección adenoviral | 47 |
| 3.12.- Silenciamiento de Rac, Akt y GSK3 β | 47 |
| 3.13.- Ensayos de retención de CEMMs en membrana | 47 |
| 3.14.- Cuantificación de la internalización de GM1 en suspensión por microscopía | 47 |
| 3.15.- Cuantificación de GM1 no internalizada en suspensión por microscopía | 48 |
| 3.16.- Extracción y cuantificación de proteínas | 48 |
| 3.17.- Inmunodetección (Western-blot) | 49 |
| 3.18.- Ensayos de determinación de la actividad Rac-GTPasa | 49 |
| 3.19.- Tratamiento con pervanadato e inmunoprecipitación de Cav1 | 49 |

| | |
|---|------------|
| 3.20.- Extracción de ARN, reacción de reversotranscripción y PCR cuantitativa..... | 50 |
| 3.21.- Inmunofluorescencia y microscopía confocal | 51 |
| 3.22.- Generación de los ratones Cav1 ^{ff} y Cav1 ^{Y/Y} | 51 |
| 3.22.1.- Generación del vector para la recombinación homóloga..... | 51 |
| 3.22.2.- Inserción por recombinación homóloga y selección de células ES positivas | 53 |
| 3.22.3.- Confirmación de la recombinación homóloga por <i>Southern blot</i> | 53 |
| 3.22.3.1.- Obtención de la sonda complementaria | 54 |
| 3.22.4.- Generación de blastocistos quiméricos | 54 |
| 3.22.5.- Obtención de ratones quiméricos y selección de transmisores..... | 54 |
| 3.22.6.- Escisión de la caja PGK-neo-stop | 55 |
| 3.23.- Genotipado y comprobación de la escisión por PCR | 55 |
| 3.24.- Mantenimiento de los ratones | 56 |
| 3.25.- Extracción y procesamiento de órganos de ratón..... | 56 |
| 3.26.- Ecocardiografía transtorácica y electrocardiografía | 56 |
| 3.27.- Cuantificación del área de los cardiomiocitos..... | 57 |
| 3.28.- Análisis estadístico | 57 |
| 4.- RESULTADOS | 59 |
| 4.1.- Regulación de la proliferación celular por Cav1 | 61 |
| 4.1.1.- La ausencia de Caveolina-1 acelera la proliferación celular | 61 |
| 4.1.2.- La ausencia de Cav1 coopera en la transformación oncogénica en MEFs..... | 63 |
| 4.1.3.- Las células deficientes en Cav1 progresan más rápido a lo largo del ciclo celular..... | 64 |
| 4.1.4.- La acumulación de ciclina D1 en células deficientes en Cav1 es independiente de la fosforilación de Erk y dependiente de activación de Rac | 67 |
| 4.2.- Regulación del crecimiento dependiente de adhesión por Cav1 | 69 |
| 4.2.1.- Las células deficientes en Cav1 son capaces de crecer independientemente de adhesión y presentan mayor resistencia al proceso de <i>anoikis</i> | 69 |
| 4.2.2.- El crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1 es Erk independiente pero requiere la activación de Rac y la vía PI3K-Akt-GSK3β | 72 |
| 4.2.3.- El defecto en el tráfico de CEMMs, así como la translocación constitutiva de Rac a lamembrana plasmática es suficiente para la progresión del ciclo celular independiente de integrinas | 78 |
| 4.2.4.- Rac y Rho tienen efectos antagónicos en la regulación del ciclo celular dependiente de adhesión | 81 |
| 4.2.5.- La internalización de CEMMs y el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión son dependientes de Cav1 pero independientes de la formación de caveolas..... | 82 |
| 4.2.6.- La fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 regula la proliferación dependiente de adhesión..... | 84 |
| 4.3.- Generación y caracterización de un nuevo modelo murino <i>knock-in</i> de expresión de Caveolina-1 no fosforilable (Cav1 ^{Y14F})..... | 86 |
| 4.3.1.- Generación de las nuevas estirpes Cav1 ^{ff} y Cav1 ^{Y/Y} | 86 |
| 4.3.2.- Validación del modelo: caracterización de MEFs | 89 |
| 4.3.2.1.- Expresión de caveolinas en MEFs Cav1 ^{ff} y Cav1 ^{Y/Y} | 89 |
| 4.3.2.2.- La proliferación celular está aumentada en células Cav1 ^{ff} y Cav1 ^{Y/Y} | 90 |
| 4.3.2.3.- Los MEFs primarios Cav1 ^{Y/Y} presentan una disregulación de la internalización de CEMMs en suspensión | 91 |
| 4.3.3.- Caracterización del fenotipo cardíaco de ratones Cav1 ^{ff} y Cav1 ^{Y/Y} | 92 |
| 4.3.3.1.- Expresión de Cav1 y Cav1 ^{Y14F} en corazón | 92 |
| 4.3.3.2.- Los corazones Cav1 ^{ff} pero no los Cav1 ^{Y/Y} , presentan disfunción sistólica y el ventrículo izquierdo dilatado, a pesar de que en ambos los cardiomiocitos son hipertróficos..... | 93 |
| 4.3.3.3.- Los corazones Cav1 ^{ff} y Cav1 ^{Y/Y} presentan diferentes anomalías en la transmisión del impulso eléctrico cardíaco..... | 96 |
| 5.- DISCUSIÓN..... | 99 |
| 6.- CONCLUSIONES | 115 |
| 7.- BIBLIOGRAFÍA | 119 |
| ANEXO: Publicaciones | 141 |

ABREVIATURAS

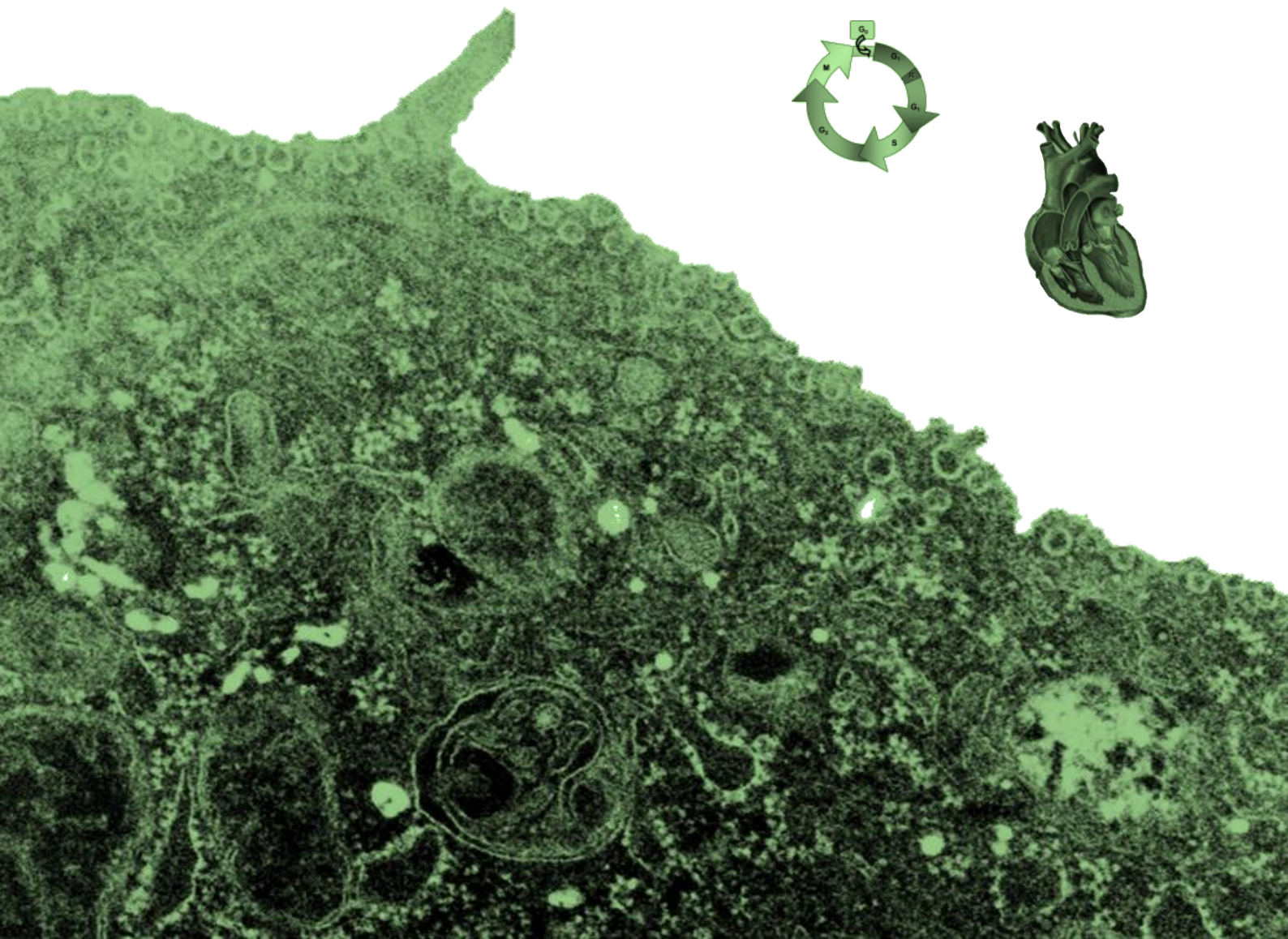


| | |
|-------------|--|
| AngII | Angiotensina II |
| AC | Adenilato ciclasa |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| AIG | <i>anchorage independent growth</i> , crecimiento independiente de adhesión |
| ANF | <i>atrial natriuretic factor</i> , factor natriurético auricular |
| AR | <i>androgen receptor</i> , receptor de andrógenos |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ARNhc | ácido ribonucleico horquillado corto |
| ARNi | ácido ribonucleico de interferencia |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| AT1 | receptor 1 de angiotensina II |
| ATM | proteína ataxia-telangiectasia mutada |
| ATR | proteína relacionada con ATM y rad3 |
| BrdU | 5'bromo-2'deoxiuridina |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino |
| Btk | Bruton tirosina-quinasa |
| CAK | <i>CDK- activating kinase</i> , quinasa activadora de CDK |
| Cav | Caveolina |
| CBD | <i>caveolin-1 binding domain</i> , dominio de unión a caveolina-1 |
| CDK | <i>cyclin-dependent kinase</i> , quinase dependiente de ciclina |
| CEMM | <i>cholesterol enriched membrane microdomain</i> , microdominio de membrana enriquecido en colesterol |
| CHK | <i>checkpoint kinase</i> , quinasa de punto de control |
| CIP/KIP | <i>CDK interacting protein/ kinase inhibitory protein</i> , proteína de interacción con CDK/proteína inhibidora de quinasa |
| CKI | <i>CDK Kinase inhibitor</i> , inhibidor de quinasa CDK |
| COX-2 | ciclooxigenasa-2 |
| CSD | <i>caveolin-scaffolding domain</i> , dominio de andamiaje de caveolina |
| Csk | c-Src tirosina-quinasa |
| CTxB | <i>choleric toxin B subunit</i> , subunidad B de la toxina colérica |
| dDIVI | Diámetro diastólico interno del ventrículo izquierdo |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> , medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento epidermal |
| EGF-R | EGF receptor, receptor de crecimiento epitelial |
| eNOS | <i>endothelial nitric oxid synthase</i> , sintasa endotelial de óxido nítrico |
| ER α | <i>estrogen receptor α</i> , receptor α de estrógenos |
| ES | <i>Embryonic Stem (cells)</i> , (células) madre embrionarias |
| FA | fracción de acortamiento |
| FAK | <i>focal adhesion kinase</i> , quinasa de adhesión focal |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> , suero fetal bovino |
| FE | fracción de eyección |
| FFA | <i>free fatty acid</i> , ácidos grasos libres |
| FoxO | Forkhead box (proteína) |
| GAP | <i>GTPase activating protein</i> , proteína activadora de GTPasa |
| GDI | <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i> , inhibidor de disociación de nucleótidos de guanina |

| | |
|-------------------|---|
| GEF | <i>guanine nucleotide exchange factor</i> , factor de intercambio de nucleótidos de guanina |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente |
| GM1 | <i>monosialotetrahexosylganglioside</i> , gangliósido de membrana |
| GPI | glicosil-fosfatidil- inositol |
| Grb7 | <i>Growth factor receptor-bound protein 7</i> , Growth factor receptor-bound protein 7 |
| GSK3 β | glucógeno-sintasa quinasa 3β |
| GST | glutation S- transferasa |
| HA | hemaglutinina |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano picante |
| IgG | inmunoglobulina G |
| INK4 | Inhibidores de CDK4 |
| IR | <i>insulin receptor</i> , receptor de insulina |
| JNK | Jun N-terminal quinasa |
| Kb | kilobase |
| KDa | kilo Dalton |
| KI | <i>knock-in</i> |
| KO | <i>knock-out</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por mitógeno |
| MEC | matriz extracelular |
| MEF | <i>mouse embryonic fibroblast</i> , fibroblasto embrionario de ratón |
| MHC | <i>myosin heavy chain</i> , cadena pesada de miosina |
| mTORC | <i>mammalian target of rapamicin</i> , diana de mamíferos de la rapamicina |
| MURC | <i>muscle restricted coiled-coiled protein</i> , proteína con dominios superenrollados específica de músculo (cavina-4) |
| neo | gen de resistencia a neomicina |
| NF- $\kappa\beta$ | factor nuclear $\kappa\beta$ |
| nNOS | <i>neuronal nitric oxide synthase</i> , sintasa neuronal de óxido nítrico |
| NO | óxido nítrico |
| NSCLC | <i>non-small cell lung cancer</i> , células no-pequeñas de cáncer de pulmón |
| PAK | <i>p21-activated kinase</i> , quinasa p21-activada |
| PBD | <i>PAK binding domain</i> , dominio de unión de PAK |
| PBS | <i>phosphate buffer saline</i> , tampón fosfato salino |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> , factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PDGF-R | PDGF receptor |
| PFA | paraformaldehído |
| PGK | fosfoglicerato-quinasa |
| pH3 | fosfo-histona 3 |
| PI3K | fosfoinositol-3 quinasa |
| PKA | proteína-quinasa A |
| PKC | proteína-quinasa C |
| PLC | fosfolipasa C |
| PLD1 | fosfolipasa D1 |
| PPVI | pared posterior del ventrículo izquierdo |
| PTRF | <i>polymerase I and transcript release factor</i> , factor de terminación de la transcripción y la polimerasa I (cavina-1) |

| | |
|-------------------|--|
| RTK | receptor tirosina-quinasa |
| scr | <i>scramble</i> , secuencia truncada |
| SDPR | <i>serum deprivation protein response</i> , proteína de respuesta a privación de suero (cavina-2) |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| SIV | septo interventricular |
| SRAA | sistema renina- angiotensina II- aldosterona |
| SRBC | <i>sdr- related gene product that binds to c-kinase</i> , producto génico relacionado con sdr, de unión a c-quinasa (cavina-3) |
| TfR | receptor de transferrina |
| TG | triglicérido |
| TGFβ-R | <i>transforming growth factor β receptor</i> , receptor del factor de crecimiento transformante |
| TK | timidina quinasa |
| TM | transmembrana |
| TRAF2 | <i>tumor necrosis factor-associated factor 2</i> , factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral α |
| UA | unidad arbitraria |
| UV | ultravioleta |
| VD | ventrículo derecho |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> , factor de crecimiento endotelial vascular |
| VEGF-R | VEGF receptor |
| VI | ventrículo izquierdo |
| VLDL | <i>very low density lipoprotein</i> , lipoproteína de muy baja densidad |
| Vol d | volumen diastólico del ventrículo izquierdo |
| WGA | <i>wheat germ agglutinin</i> , aglutinina de germen de trigo |
| wt | <i>wild type</i> , fenotipo silverstre |
| Y14F | sustitución de la tirosina en posición 14 por fenilalanina |
| Y14-p-Cav1 | Y14-fosfo-caveolina-1 |
| β ₂ AR | receptor β ₂ adrenérgico |
| γ-tub | γ-tubulina |

1.- INTRODUCCIÓN



1.1.- Las células y su entorno: transducción e integración de señales.

1.1.1.- Señalización extracelular.

Las funciones vitales de cada célula están controladas, en gran parte, por el entorno que la rodea. Para que esto ocurra, se hace necesaria la transducción de señales desde el exterior al interior celular. Estos tipos de señales pueden ser tanto moléculas solubles como la unión a otras células y a la matriz extracelular (tabla I1). Dependiendo del estímulo, existen diferentes receptores celulares que se encargan de su recepción y transducción, desencadenando una cascada de señalización determinada, que dará lugar a una respuesta celular concreta ⁽⁴⁾.

Tabla I1: Diferentes tipos de señales extracelulares que puede recibir una célula, así como los tipos de receptores que son capaces de activar.

| | | | | |
|---|--|------------------------------|--|--|
| Moléculas solubles extracelulares | Receptores nucleares | | | |
| | Receptores de superficie | acoplados a canales iónicos | | |
| | | acoplados a proteínas G | | |
| | | acoplados a enzimas | Receptores tirosina-quinasa (RTKs) | |
| | | | Receptores asociados a tirosina-quinasas | |
| Receptores serina/treonina-quinasa | | | | |
| Receptores asociados a histidina-quinasas | | | | |
| | | Receptores guanilato-ciclasa | | |
| Adhesión intercelular | Receptores de superficie (proteínas de adhesión) | Cadherinas | | |
| | | Selectinas | | |
| | | Inmunoglobulinas | | |
| | | Integrinas | | |
| Adhesión a matriz extracelular | Receptores de superficie (proteínas de adhesión) | Integrinas | | |

1.1.2.- Adhesión a matriz extracelular.

En la mayoría de los casos, las células residen embebidas en una red de proteínas y polisacáridos, llamada matriz extracelular (MEC), que es secretada al espacio intercelular y moldeada por las propias células ^(4, 85). La MEC, a su vez, ejerce una gran influencia sobre las células que están adheridas a ella, controlando diversos procesos como son la migración, proliferación y supervivencia celular. Por tanto, la adhesión a MEC es un requisito imprescindible para la vida celular, siendo la excepción ciertas células muy diferenciadas como las células sanguíneas y las de los estratos suprabasales de epitelios pluriestratificados ⁽⁴⁾.

1.1.2.1.- Integrinas

Los receptores más importantes de la matriz extracelular son las integrinas, glicoproteínas transmembrana que se expresan en prácticamente todos los tejidos y tipos celulares en el Reino Animal. Las integrinas son heterodímeros, constituídos por una subunidad α y otra β . Poseen un dominio extracelular, de unión a proteínas de MEC, y un extremo citoplásmico, por el que se unen a diversas moléculas de señalización y componentes del citoesqueleto^(119, 120).

Las integrinas se caracterizan por su capacidad de transmitir información en dos direcciones⁽²⁸¹⁾. Por un lado se da una señalización intracelular (activación *inside-out*, desde dentro hacia fuera) que modula la conformación de las integrinas y su grado de afinidad por el ligando. Esta activación está regulada por la unión de quimioquinas, factores de crecimiento y otros ligandos a sus respectivos receptores^(120, 190). Por otro lado, la activación de las integrinas por unión a ligandos de MEC (activación *outside-in*, desde fuera hacia dentro) induce un reagrupamiento de integrinas que lleva al reclutamiento hacia su cola citosólica de múltiples moléculas de señalización, así como filamentos de actina^(95, 120). Así, a pesar de no tener actividad enzimática, las integrinas son capaces de regular la ordenación del citoesqueleto, estableciendo un vínculo físico entre éste y la MEC, y de activar diferentes rutas de señalización intracelular. Esto conduce a la modulación de múltiples procesos, como son la migración, progresión del ciclo celular, supervivencia y diferenciación^(85, 251, 252).

De hecho, la pérdida de adhesión por integrinas conduce a la activación de vías apoptóticas, en un proceso llamado *anoikis*^(72, 73, 98), así como a un bloqueo en la progresión del ciclo celular, ya que las integrinas regulan el crecimiento dependiente de adhesión^(10, 47). Además, se ha visto que la regulación de estos procesos es específica del tipo de integrina, asegurando la viabilidad celular en el contexto adecuado⁽⁸⁵⁾. Esto preserva la integridad de los tejidos y la viabilidad del organismo.

1.1.3.- Regulación coordinada de la señalización por integrinas y otros receptores de superficie.

Para asegurar un control estricto de la integración de las señales extracelulares que recibe la célula, existe un solapamiento e inter-regulación de las vías de transducción empleadas por integrinas y otros receptores celulares. Frecuentemente se utilizan las mismas vías pero a diferentes niveles, con lo cual se consiguen efectos sinérgicos entre la señalización por integrinas y otros receptores. Por ejemplo, la activación de las vías Erk, JNK, p38, Rac, Rho, Cdc42, PI3K, NF- κ B y JAK-STAT por factores solubles está fuertemente influenciada por integrinas^(238, 250, 251). Además, se ha visto que existe un control, por parte de integrinas, de la activación de receptores de hormonas y de factores de crecimiento, como insulina, PDGF, EGF

y VEGF ^(85, 320), también se han descrito fenómenos de transactivación de receptores de factores de crecimiento tirosina-quinasa tras la unión de integrinas a MEC ^(180, 298). Por otra parte, la activación de receptores de factores de crecimiento puede conducir a la activación de integrinas ⁽²⁵⁾, produciéndose el fenómeno de activación *inside-out*, previamente comentado.

Otra forma por la cual las integrinas pueden modular, de manera indirecta, la transducción de señales es mediante la regulación de la localización de diferentes moléculas señalizadoras a dominios específicos de la membrana plasmática. Es en estos microdominios, denominados CEMMs (*cholesterol enriched membrane microdomains*), donde estas moléculas pueden interactuar con sus efectores para iniciar cascadas de señalización determinadas ^(39, 48, 50, 51, 196, 224). En el caso de las Rho-GTPasas, las integrinas controlan su unión a la membrana plasmática mediante la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión a sustrato ⁽⁴⁸⁾.

Lo anteriormente expuesto indica que mediante la sinergia e interrelación entre las rutas de señalización de ambos tipos de receptores se crea una red de transducción de señales que controla procesos de supervivencia, proliferación, migración y diferenciación celular en el contexto adecuado. La desregulación de estas vías puede llevar a la aparición de neoplasias y procesos tumorigénicos, en las que las células han sido capaces de escapar al estricto control de la integración de las cascadas de señalización provocadas por estímulos externos.

1.1.3.1.- Rho-GTPasas como integradores de señalización.

En concreto, la familia de las Rho-GTPasas tiene un papel central integrando señales de integrinas y receptores de factores de crecimiento ^(13, 65, 226). Las Rho-GTPasas regulan procesos como polarización celular y migración, tráfico de membrana, progresión del ciclo celular, expresión génica y transformación oncogénica ^(194, 232, 290). Esto requiere la interacción con sus efectores, lo que ocurre cuando la GTPasa está unida a GTP. La unión a GTP está estrechamente regulada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que inducen su activación, y por proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs) que catalizan su inactivación ⁽²⁴⁶⁾ (figura 11). Además, existen inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (Rho-GDIs), que mantienen a las Rho-GTPasas solubles en el citoplasma ^(117, 193, 278) y bloquean su sitio de unión con el efector ⁽⁵⁰⁾.

Numerosos estudios han identificado alteraciones en la señalización a través de Rho-GTPasas que están relacionadas con transformación celular, invasión tumoral y metástasis ⁽²³²⁾.

La actividad de las GTPasas se ve modulada por integrinas. No sólo regulan su unión a GTP ^(8, 51, 174, 223), sino que también se ha demostrado que controlan la translocación, en el caso de Rac-GTP y Cdc42, a zonas específicas de la membrana plasmática denominadas CEMMs ⁽⁵⁰⁾,

donde son capaces de interactuar con sus efectores ⁽⁵¹⁾. En células no adherentes, Rac-GTP permanece en el citoplasma unido a Rho-GDI, en lugar de ser reclutado a la membrana plasmática y quedando desacoplado de sus efectores ⁽⁵⁰⁾. Además, como ya se ha comentado, las integrinas controlan la unión de Rho-GTPasas a la membrana plasmática mediante la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión a sustrato ⁽⁴⁸⁾.

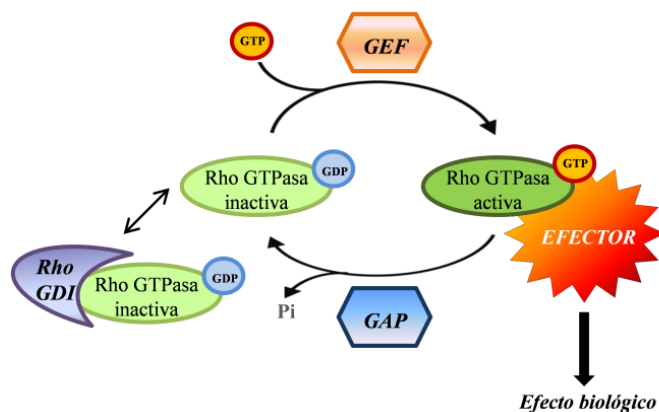


Figura II: Ciclo de activación de las Rho-GTPasas. Las Rho-GTPasas ciclan entre un estado activo, unidas a GTP, y un estado inactivo, unidas a GDP. La transición de un estado a otro está controlada por proteínas GEF, GAP y GDI. Sólo cuando la GTPasa está cargada con GTP es capaz de interactuar con sus efectores, provocando una respuesta biológica.

1.2.- El ciclo celular.

El ciclo celular es el proceso por el cual una célula se divide, mediante la replicación y segregación de su material genético y el reparto de su citoplasma, para dar lugar a dos células hijas. Este proceso suele estar estrechamente relacionado con el de crecimiento celular, por el que la célula aumenta su tamaño antes de su división ⁽¹⁶⁶⁾.

1.2.1.- Fases del ciclo celular.

Durante el ciclo celular pueden distinguirse cuatro fases bien definidas: fase S o de síntesis, fase M o mitosis, y fases G1 y G2 o fases *gap* ⁽¹⁸⁸⁾. En la fase de síntesis tiene lugar la generación de una copia de ADN genómico, mientras que en la fase de mitosis se dan los procesos que aseguran la correcta segregación de cada una de esas copias a una célula hija. Intercaladas entre estas fases esenciales del ciclo celular aparecen las fases G1 y G2, en las que la célula se prepara para la correcta consecución de las fases S y M, respectivamente. La duración de estas fases G es variable, dependiendo del tipo celular y del contexto en el que la célula se encuentre. De hecho, en la fase G1 tiene lugar la integración de diversas señales que afectan al progreso del ciclo celular; en esta fase, la célula detecta la disponibilidad de nutrientes, la presencia o ausencia de señales mitogénicas adecuadas y la integridad del material genético, lo que va a decidir si el ciclo celular progresa o es arrestado ⁽¹⁷⁰⁾. En esta fase, el punto de restricción “R” marca el momento a partir del cual, y de manera irreversible, el ciclo celular

puede progresar independientemente de señales mitogénicas. Este punto subdivide la fase G1 en temprana y tardía ⁽¹⁶⁶⁾.

Cuando las células dejan de proliferar, ya sea por la ausencia de señales mitogénicas apropiadas, o por la presencia de señales antimitogénicas específicas, entran en una fase latente de quiescencia, o fase G0. La salida de esta fase puede darse de nuevo si la célula vuelve a recibir las señales adecuadas.

1.2.2.- Activación del ciclo celular.

La progresión a través de ciclo celular está controlada por la actividad de quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent-kinases*, CDKs) (revisado en ^(164, 166, 257)) (figura I2). Las CDKs más importantes son CDK4, CDK6, CDK2 (todas ellas de interfase) y CDK1 (mitótica) ⁽¹⁶⁴⁾. Su actividad requiere la unión de ciclinas, subunidades reguladoras que son sintetizadas y destruidas de manera secuencial a lo largo del ciclo celular (figura I2). Así, las ciclinas tipo D (D1, D2 y D3, específicas de tejido) se unen a CDK4 y CDK6 para formar complejos activos responsables de la progresión a través de la fase G1 temprana ⁽¹⁶⁶⁾. CDK2 es secuencialmente activada por ciclinas tipo E (E1 y E2, ubicuas en células somáticas) para la regulación de la transición G1/S ⁽¹¹⁶⁾, y por ciclina A2 (A1, en células germinales) durante la fase S. Por último, CDK1 se une a ciclina A durante la fase G2 y a ciclina B durante la fase de mitosis ⁽¹⁶⁵⁾.

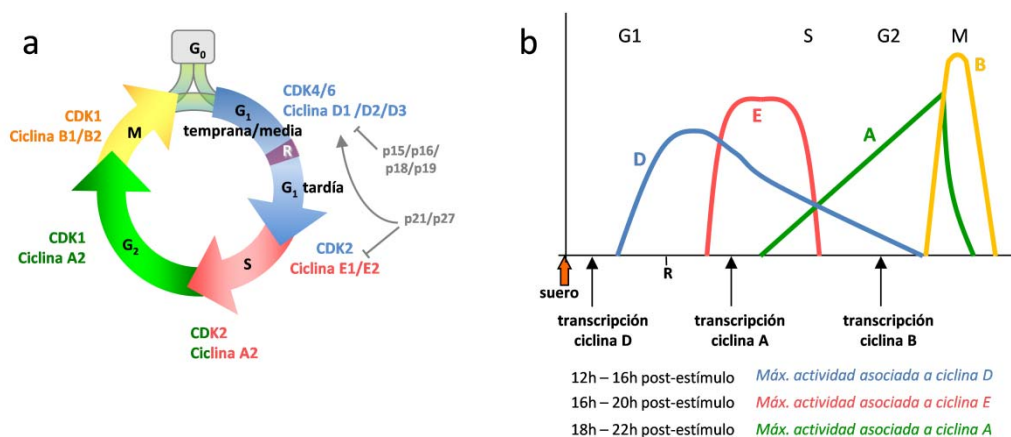


Figura I2: Control de la progresión del ciclo celular. (a) La actividad de las quinasas CDKs controlan la progresión del ciclo celular. A su vez, la activación de CDKs está regulada por ciclinas y CKIs (*CDK kinase inhibitors*) de la familia INK4 y la familia CIP/KIP. (b) Por su parte, la expresión de ciclinas se regula de manera temporal a lo largo del ciclo celular, lo que lleva a una activación cíclica de las CDK. Se indican la cinética de activación en MEFs.

La ciclina D1 se une a CDK4 y CDK6 para formar un complejo activo, cuyos sustratos primarios son los miembros de la familia retinoblastoma (pRb, p107 y p130) ^(3, 179), que regulan la actividad de factores de transcripción de la familia E2F, desencadenando la entrada del ciclo

en fase S. Así, la fosforilación parcial de la proteína retinoblastoma 1 (pRb1) permite la disociación de los factores de transcripción E2F, y la consiguiente transcripción de genes relacionados con la progresión del ciclo celular, como son las ciclina E y A ^(104, 162). El complejo CDK2-ciclina E fosforila a su vez a pRb, inactivándola completamente, así como a otros sustratos ⁽²⁷⁵⁾, y permitiendo la transcripción de genes implicados en la transición G1/S.

El complejo CDK4/6-ciclina D1 tiene, además, otro papel en la progresión del ciclo celular, uniéndose, sin perder su actividad, a los inhibidores CIP/KIP, impidiendo su acción inhibitoria sobre el complejo CDK2-ciclinaE y permitiendo la entrada en fase S ^(166, 170, 258).

Por tanto, el control estricto de la expresión de ciclina D1 es crucial en la regulación de la progresión de la fase G1, y entrada en fase S. Esto queda patente en el hecho de que células carentes de ciclinas D presentan deficiencias en la capacidad de salida de quiescencia ⁽²⁵⁹⁾, así como que el silenciamiento específico de ciclina D1 inhibe la entrada en fase S en estudios *in vitro* ⁽²⁹²⁾.

Además de las ciclinas como activadores de las CDKs existen otros niveles de regulación de estas quinasas, como pueden ser por la fosforilación del complejo CDK-ciclina en núcleo por parte de la quinasa activadora de CDK (*CDK-activating kinase*, CAK) ^(166, 208), lo que posibilita la fosforilación de los sustratos por CDK. También se dan fosforilaciones inhibitorias (en residuos de unión a ATP) del complejo CDK-ciclina por parte de Wee/MIK1 o Myt1. Las fosfatasas de la familia Cdc25 eliminan esa fosforilación, activando de nuevo el complejo ^(166, 208).

Por último, la actividad de las CDKs se ve modulada por inhibidores específicos: CKIs (*CDK kinase inhibitors*), que se inducen en respuesta a diferentes procesos celulares ^(257, 258) o se inhiben tras estimulación mitogénica ⁽¹⁷⁰⁾. Estos inhibidores pueden dividirse en dos tipos (revisado en ⁽²⁵⁸⁾): la familia INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}) que ejercen su inhibición uniéndose a CDK4 y 6 impidiendo su unión a ciclinas D; y la familia CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}) que forman heterodímeros con las CDKs de las fases G1/S e inhiben específicamente la actividad de los complejos formados por CDK2 y ciclina E (figura I2).

Para garantizar la correcta consecución del ciclo celular y prevenir situaciones de inestabilidad genómica y cromosómica, las células han desarrollado una serie de puntos de control que evitan la entrada en una nueva fase del ciclo hasta que las anteriores no estén convenientemente completadas ⁽¹²⁹⁾. Estos puntos de control tienen lugar en las transiciones de las fases G1/S y G2/M y están asociados a la detección de daño en el material genético, involucrando a las quinasas proximales ATM y ATR y a las CHK1 y 2 (*checkpoint kinases*) ^(129, 164). Estas, en última instancia, modulan diferentes reguladores de la actividad de las CDKs,

afectando a la progresión del ciclo celular hasta que el daño sea reparado. De manera similar, existe otro punto de control entre la metafase y la anafase de la mitosis, que controla el correcto ensamblaje del huso mitótico, y que modula la actividad de CDK1 ⁽¹⁶⁴⁾.

Por tanto, la regulación del ciclo celular es un proceso secuencial complejo, en el que se da la integración de diversos factores externos e internos para garantizar la integridad celular a lo largo de todas las fases del ciclo de división.

1.2.3.- Regulación de la entrada y progresión del ciclo celular por factores externos.

Como ya se ha mencionado, las ciclinas son proteínas de vida media muy corta que se sintetizan y degradan proteolíticamente a lo largo del ciclo celular para activar de forma secuencial las diferentes CDKs ^(166, 208, 259). Dada su importancia para la progresión del ciclo, su expresión está regulada de forma muy precisa.

La activación del ciclo celular requiere la integración en la fase G1 de múltiples señales recibidas tanto por parte de factores de crecimiento, como por adhesión a la MEC ^(10, 252). Esto regula la expresión y estabilización de ciclina D1, que es el evento desencadenante de la salida de quiescencia y la progresión del ciclo celular, puesto que el resto de fases del ciclo (S, G2 y M) son independientes de factores de crecimiento y adhesión a sustrato ^(166, 170).

La expresión de ciclina D1 se induce en respuesta a diversas señales mitogénicas, que activan vías de señalización tales como MAPK-Erk, JNK, Rac y PI3K ^(128, 154, 258). Éstas son reguladas por la adhesión a MEC dependiente de integrinas. Así, por ejemplo, la inducción de la vía MAPK-Erk dependiente de factores de crecimiento requiere la adhesión a matriz extracelular mediada por integrinas ⁽²⁹⁶⁾. Además, se ha descrito que otras vías de señalización implicadas en la expresión y estabilidad de ciclina D1, como Src, JNK, FAK, PI3K y Rho-GTPasas son dependientes de adhesión a través de integrinas ^(10, 252, 320).

Por tanto, la regulación coordinada de la transducción de señales mitogénicas y adhesión a la MEC es necesaria para controlar que la proliferación celular se dé sólo cuando las condiciones en las que se encuentra la célula son las adecuadas. La desregulación de estas vías de señalización puede permitir la progresión del ciclo celular en condiciones que deberían ser restrictivas. En células cancerígenas, la expresión de oncogenes y la pérdida de supresores tumorales hace que las rutas de señalización dependientes de integrinas estén alteradas, llevando al crecimiento celular independiente de adhesión (*anchorage independent growth*, AIG) y a una mayor migración e invasividad celular ⁽²⁵²⁾. Esta capacidad de AIG es, de hecho, una de las características *in vitro* que mejor correlaciona con tumorigénesis *in vivo* ⁽⁷¹⁾.

1.2.3.1.- Rho-GTPasas en la regulación del ciclo celular.

En cuanto a su implicación en la regulación del ciclo celular, se ha descrito que la GTPasa Rac1, en su forma activa (unida a GTP), puede conducir a la transcripción de ciclina D1 en respuesta a señalización por integrinas y receptores de factores de crecimiento por vías que implican distintas cascadas de señalización como son JNK, PI3K, NF κ B o MAPK ^(35, 174, 226). Además, Rac1 también contribuye a la traducción de ciclina D1 y a la fosforilación de la proteína retinoblastoma (pRb) ⁽⁸⁸⁾, lo que conduce a la progresión del ciclo celular.

También se ha descrito que las Rho-GTPasas RhoA y Rac1 regulan coordinadamente la expresión temporal de ciclina D1. Mientras que la señalización a través de Rac1 lleva a una expresión de ciclina D1 en la fase G0/G1 temprana, su correcta expresión en la fase G1 tardía requiere niveles sostenidos de fosforilación de Erk, lo que es dependiente de RhoA. Por tanto, se necesita un balance preciso en la activación de ambas Rho-GTPasas para la correcta expresión temporal de ciclina D1, y la consecuente progresión a través del ciclo celular ⁽³⁰³⁾.

1.2.3.2.- PI3K en la fase G1/S del ciclo celular.

La vía PI3K-Akt también está implicada en la regulación positiva de la progresión a través de las fases G1/S del ciclo celular. Esta regulación se da a múltiples niveles.

En primer lugar, se ha descrito que PI3K regula la expresión de ciclina D1 a través de Akt ^(84, 86) o, indirectamente, mediante la regulación de la activación de Rac ⁽¹⁰⁷⁾, lo que conduce a una progresión a través de la fase G1 del ciclo celular.

Por otra parte, PI3K-Akt contribuye a la localización y estabilización de ciclina D1, mediante la inhibición de la quinasa GSK3 β . Esta quinasa es la responsable de la salida de ciclina D1 del núcleo durante la fase S, para su posterior degradación proteosómica ^(55, 166, 259) y la consecuente inactivación de las CDK4 y 6. Además, GSK3 β induce la degradación de β -catenina, afectando a la transcripción de ciclina D1 ⁽²⁸⁵⁾.

Por último, PI3K-Akt inhibe los factores de transcripción FoxO, reprimiendo así la expresión de los inhibidores p27^{KIP1}, p21^{CIP1} ^(154, 294), lo que favorece la actividad de CDKs de fase G1/S.

La activación de esta vía de señalización también está regulada por integrinas ⁽²⁹⁶⁾. Además se ha visto que, tras la pérdida de adhesión a MEC, la activación de PI3K-Akt se ve disminuida ⁽⁴⁸⁾, apuntando a un posible papel en la regulación del crecimiento celular dependiente de adhesión.

Por tanto, la señalización conjunta a través de receptores de factores de crecimiento e integrinas regula coordinadamente la activación de CDKs de las fases G1/S, tanto promoviendo la expresión y estabilización de ciclina D1, como regulando negativamente los inhibidores de CDK2: p21 y p27 ^(46, 118, 143, 213, 296).

1.3.- Membrana plasmática y transducción de señales.

1.3.1.- Microdominios de membrana.

La membrana plasmática es una estructura crucial para la vida celular, ya que delimita el citoplasma, manteniendo las diferencias esenciales entre su contenido y el espacio extracelular. Así, compartimenta multitud de reacciones químicas y tiene un papel fundamental en la comunicación de la célula con su entorno. La membrana plasmática es una estructura dinámica, relativamente impermeable y fluída, en la que la mayoría de sus moléculas pueden desplazarse en el plano de la membrana ⁽⁴⁾. Si bien la estructura básica de la membrana plasmática está constituida por una bicapa lipídica, a la que se encuentran asociadas o embebidas multitud de proteínas esenciales para su función, diversos trabajos han demostrado que esta estructura no es homogénea, sino que pueden distinguirse en ella una serie de dominios, o plataformas móviles, llamados balsas lipídicas (*lipid rafts*) o microdominios de membrana enriquecidos en colesterol (CEMMs, del inglés *cholesterol enriched membrane microdomains*) ^(21, 49, 156, 262). Estos dominios son el resultado del empaquetamiento selectivo de colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomielina), confiriendo a la membrana un estado de fase líquido-ordenada, resistente a la solubilización con diversos detergentes ⁽²²⁾. Además se concentran en estos dominios ciertas proteínas con unas características físico-químicas determinadas, como son proteínas de anclaje a GPI (glicosil fosfatidil inositol), proteínas transmembrana y proteínas aciladas. Aunque la existencia de CEMMs en membranas biológicas ha despertado cierta controversia, diversos estudios biofísicos, de microscopía de alta resolución y lipidómica, avalan esta heterogeneidad de la membrana plasmática ^(101, 261).

Se ha sugerido que estos CEMMs desempeñan un papel importante en la regulación del tráfico de membrana y en la señalización, debido a su capacidad de compartimentar diferentes procesos celulares ⁽²⁶³⁾.

1.3.2.- Caveolas.

Las caveolas han sido definidas como un subtipo de microdominios de membrana, semejantes a CEMMs, ya que sus componentes lipídicos son principalmente colesterol y esfingolípidos y están enriquecidas en proteínas de anclaje a GPI. La característica definitoria de este subtipo de microdominios de membrana es la presencia de la proteína caveolina, que les confiere unas características morfológicas y funcionales determinadas (figura I3).

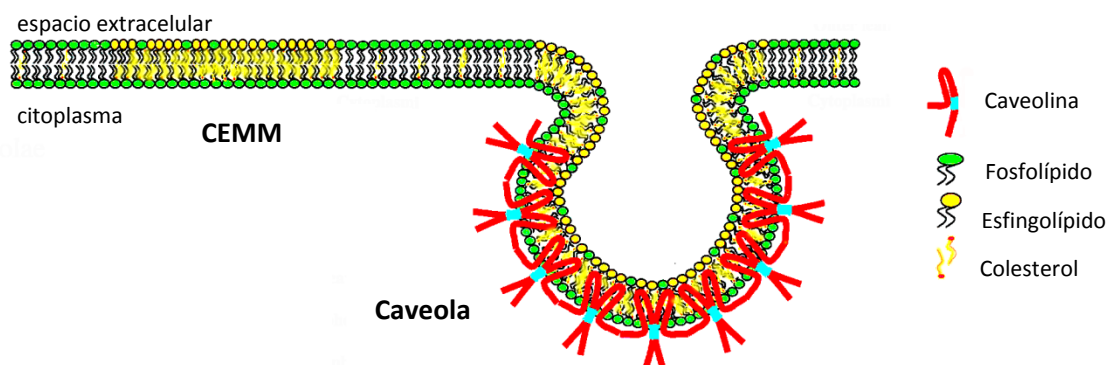


Figura I3: Organización de los CEMMs y las caveolas. **CEMMs.** La “fase líquido-ordenada” presenta un alto contenido en esfingolípidos (esfingomielina y glicoesfingolípidos) y es rica en colesterol. La “fase líquido-desordenada” se compone básicamente de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina). **Caveolas.** La inserción de Cav1 en estos microdominios de membrana es necesaria para la aparición de caveolas (figura adaptada de ⁽²²¹⁾).

De hecho, las caveolas fueron inicialmente descritas mediante microscopía electrónica ^(195, 319) como invaginaciones de membrana de unos 50 a 100nm, con forma de letra omega (Ω). Esta definición se ha ampliado en la actualidad para incluir otro tipo de estructuras en forma de rosetas o racimos, así como de invaginaciones tubulares (figura I4), todas ellas resultado de la fusión de múltiples caveolas individuales ^(60, 205, 221, 274). Estas estructuras aparecen en la mayoría de las células de vertebrados, siendo especialmente abundantes en adipocitos, células endoteliales, fibroblastos y células musculares.

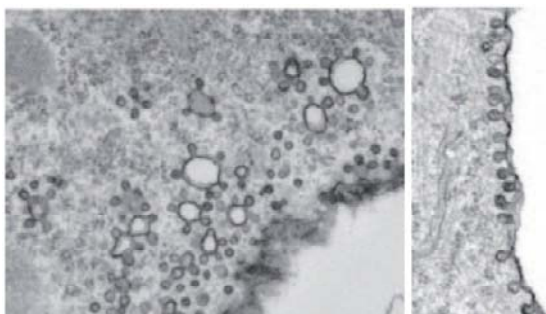


Figura I4: Morfología de las caveolas. Imágenes de microscopía electrónica de adipocitos, en las que se muestran diferentes formas de caveolas. Se observan caveolas individuales, en forma de Ω , así como vesículas internalizadas, y complejos de caveolas con forma de rosetas o racimos (figura adaptada de ⁽²⁰³⁾).

Además de las caveolinas, recientemente se han identificado otro tipo de proteínas fundamentales para la formación de caveolas, llamadas cavininas, con funciones adaptadoras y estabilizadoras ^(41, 113).

Las caveolas participan en multitud de procesos fisiológicos, entre los que destacan la endocitosis, el tráfico de membrana ⁽⁷⁾, la homeostasis del colesterol ^(221, 266), así como diversos procesos de señalización ^(203, 234). En este aspecto, se han propuesto las caveolas como plataformas de membrana que modulan la transducción de señales, ya que en ellas se concentran multitud de moléculas de señalización, incluyendo receptores, transductores y efectores ^(7, 256). Potencialmente, esto lleva a la regulación, por parte de las caveolas, de diversos procesos tales como la polarización celular, migración, supervivencia y proliferación celular ^(52, 95, 234, 263).

Además, estas plataformas son utilizadas como vía de entrada por múltiples patógenos ^(203, 206), y recientemente se ha descrito la función de caveolas en mecanorrecepción y como reservorio fisiológico de membrana ⁽²⁶⁴⁾.

La biogénesis de las caveolas requiere la síntesis de caveolinas en el retículo endoplásmico rugoso, como proteínas integrales de membrana ⁽¹⁷⁷⁾. Posteriormente, en el aparato de Golgi, se asocian a microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingolípidos ^(157, 210), gracias a la capacidad de las caveolinas de unirse a estos lípidos. Entonces las estructuras precursoras de las caveolas son transportadas a la superficie celular, siguiendo la ruta secretora ⁽⁵⁹⁾. El paso final en la maduración de las caveolas es la unión de complejos de cavina, ya en la membrana plasmática, que estabilizan la estructura ⁽¹⁰⁹⁾.

1.3.2.1.- Caveolinas.

El principal componente proteico y estructural de las caveolas está constituido por las caveolinas ⁽²⁰²⁾, proteínas integrales de membrana de entre 21 y 25 kDa ⁽¹⁹²⁾. Se han identificado tres miembros dentro de la familia génica de las caveolinas: Caveolina-1 (Cav1), Caveolina-2 (Cav2) y Caveolina-3 (Cav3) (Figura I5). El gen que codifica para Cav1 se compone de tres exones muy conservados en todas las especies, y se han descrito dos isoformas, una predominante, Cav1- α , de 178 residuos, y una isoforma minoritaria, Cav1- β , a la que le faltan los 31 primeros residuos ⁽²⁴²⁾. Estas dos isoformas se generan tanto a partir del mismo ARNm gracias a dos codones de iniciación alternativos, como a partir de ARNm independientes ⁽¹³⁷⁾. El gen de Cav2 también está constituido por tres exones, y da lugar a tres isoformas (α , β y γ) ^(78, 240, 241), siendo Cav2- α , de 162 residuos, la predominante. Por último, el gen de Cav3 está compuesto por dos exones que codifican para una proteína de 151 residuos ⁽²⁸³⁾.

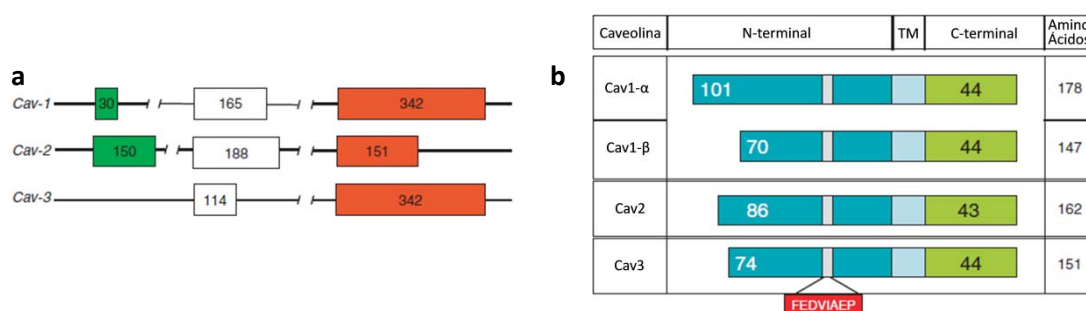


Figura I5: Familia génica de las caveolinas. **a:** Distribución de los exones en *cav1*, *cav2* y *cav3*; se muestra el número de nucleótidos en cada exón. **b:** Esquema de las proteínas Cav1- α , Cav1- β , Cav2 y Cav3. Se destacan los dominios N-terminal, C-terminal y transmembrana (TM), así como el motivo altamente conservado FEDVIAEP (adaptado de ⁽¹¹⁵⁾).

Aunque el origen evolutivo de las caveolinas no está totalmente dilucidado, hay indicios de que Cav2 podría ser el precursor genómico de Cav1 y Cav3 ⁽³¹⁰⁾. Además, las secuencias

aminoacídicas que presentan una mayor homología son las de Cav1 y Cav3⁽³¹⁰⁾. Si bien estos tres miembros de la familia han sido identificados en vertebrados, existen genes ortólogos de caveolina en no vertebrados como nematodos (*C. elegans*) e insectos^(133, 282), lo que indica que los genes que codifican para caveolina están muy conservadas a lo largo de la evolución.

A pesar de su similaridad en estructura y función, las diferentes caveolinas presentan una distribución diferencial: mientras Cav1 y Cav2 se co-expresan en prácticamente todos los tejidos, salvo en músculo estriado, siendo especialmente abundantes en adipocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso y pneumocitos tipo I^(192, 240, 242, 310), Cav3 se expresa preferencialmente en células musculares estriadas^(268, 284, 301), así como en las del músculo cardíaco y músculo liso, aunque también aparece en células astrogiales⁽¹⁸⁷⁾ y neuronas de ganglios vegetativos⁽¹³⁴⁾. Las caveolinas más importantes para la formación de caveolas son Cav1, ya que ratones deficientes en esta proteína carecen de estas estructuras^(58, 217), y Cav3, que es necesaria para la formación de caveolas en músculo estriado⁽⁷⁶⁾. Sin embargo, Cav2 no es necesaria para la biogénesis de caveolas, aunque oligomeriza con Cav1 y necesita de esta proteína para alcanzar la membrana plasmática⁽²⁰¹⁾, por eso se piensa que Cav2 actúa como una “proteína accesoria” junto con Cav1⁽¹⁹²⁾.

Aunque las caveolinas son necesarias para la formación de caveolas, se ha descrito que la sobreexpresión de Cav1 en células endoteliales no aumenta el número de estas estructuras⁽¹⁵⁾. Además las caveolinas se expresan, a bajos niveles, en células donde no se detectan caveolas (como linfocitos⁽¹⁰⁵⁾ y neuronas⁽²³⁾). Todos estos datos parecen indicar, por un lado, que existen otros componentes necesarios para la biogénesis de caveolas, y por otro que las caveolinas pueden ser importantes en otras funciones más allá de su papel en la formación de caveolas. En este sentido, se ha descrito que, además de su papel estructural, las caveolinas tienen una función importante en la modulación de la transducción de señales^(36, 160, 181, 192, 218, 256, 265), como se verá más adelante.

Se han descrito en humanos múltiples alteraciones y patologías asociadas a la desregulación o mutación de caveolinas, como la lipodistrofia⁽⁸¹⁾, disfunción mitocondrial⁽¹⁹⁾ o cáncer de mama⁽¹⁴⁵⁾, asociadas a alteraciones de Cav1 y diversas distrofias musculares, llamadas caveolinopatías⁽⁸³⁾, asociadas a mutaciones en Cav3.

1.3.2.2.- *Cavinas*.

Las cavinas son una familia de proteínas que han sido recientemente relacionadas con la formación, estabilización y dinámica de las caveolas, actuando como reguladores de la función y organización de las caveolinas^(2, 14, 102, 113, 158, 173). Esta familia de proteínas, exclusiva de

vertebrados, consta de cuatro miembros (cavinas -1, -2, -3 y -4), que presentan una gran homología de secuencia, y comparten ciertas características estructurales como son un dominio de cremallera de leucina, implicado en interacciones proteína-proteína, y dominios PEST (dominios ricos en prolina, ácido glutámico, serina, treonina), para su degradación proteolítica⁽²⁾. Además son capaces de unirse a fosfatidilserina y susceptibles de fosforilación en múltiples residuos⁽²⁾.

El primer miembro de la familia que se relacionó con las caveolas fue Cavina-1, también conocida como PTRF (*polymerase I and transcript release factor*), previamente identificada como un factor de transcripción de la polimerasa I^(124, 125). Se describió su presencia en caveolas^(2, 293), y su implicación en la formación y organización de estas estructuras^(113, 159). Posteriormente, y por homología de secuencia, se identificaron y renombraron los otros tres miembros de la familia de las cavinas.

PTRF (Cavina-1) es reclutada a dominios caveolares en la membrana plasmática, y es necesaria para la formación y maduración de caveolas^(113, 159). La ausencia de PTRF reduce el número de caveolas^(113, 159), y aumenta la movilidad lateral y degradación lisosomal de Cav1, aunque esta proteína sigue apareciendo en dominios aplanados de la membrana plasmática⁽¹¹³⁾. A pesar de que PTRF y Cav1 colocalizan en las caveolas, su interacción parece ser indirecta y dependiente de colesterol⁽¹¹³⁾. PTRF parece tener un papel crucial en la maduración y formación de caveolas a nivel de la membrana plasmática, así como en la estabilización de caveolina en estos microdominios. PTRF se expresa en prácticamente todos los tejidos, incluyendo el muscular, apareciendo asociada tanto a Cav1 como Cav3. De hecho, los fenotipos asociados al ratón deficiente en PTRF son similares a los de los ratones dobles deficientes en Cav1 y Cav3⁽¹⁰³⁾.

Cavina-2 fue inicialmente identificada como una proteína cuya expresión se inducía por privación de suero⁽⁹⁹⁾, de ahí su nombre original SDPR (*serum deprivation protein response*). Posteriormente, se observó que esta proteína se unía a PKC α , y que se localizaba en caveolas⁽¹⁷⁵⁾, teniendo un papel importante en su formación⁽¹⁰²⁾. Cavina-2 se une directamente a PTRF, siendo capaz de reclutarla a la membrana plasmática; además, Cavina-2 es necesaria para la expresión estable tanto de Cav1 como de PTRF. La sobreexpresión de Cavina-2 no parece aumentar el número de caveolas, pero sí provoca cambios en su morfología, que tiende a ser alargada y tubular, lo que sugiere una implicación en la generación de curvatura de membrana⁽¹⁰²⁾.

En cuanto al tercer miembro de la familia, Cavina-3, también conocido como SRBC (*sdr-related gene product that binds to c-kinase*), fue inicialmente identificado como una proteína de

unión a PKC δ ^(122, 318), pero no se describió su localización en las caveolas hasta más tarde ⁽¹⁷³⁾, así como su implicación en la formación de vesículas caveolares. Esta proteína co-precipita con Cav1, cuya presencia es necesaria para la localización de Cavina-3 en la membrana plasmática.

Cavin-4 o MURC (*muscle restricted coiled-coiled protein*), el miembro de incorporación más reciente a la familia, fue descrita originalmente como una proteína citosólica específica del músculo esquelético y cardíaco ^(191, 279). Después se identificó como una proteína predominantemente expresada en músculo, asociada a los complejos caveolares del sarcolema ⁽¹⁴⁾, donde colocaliza con Cav3.

Se ha demostrado recientemente que todos los miembros de la familia de las cavininas interactúan formando complejos multiméricos en el citosol ⁽¹⁴⁾, que posteriormente son reclutados a las caveolas, donde cumplen sus funciones de estabilización, maduración y modulación de caveolas (resumido en figura I6). Al contrario que su reclutamiento a caveolas, la formación de los complejos citosólicos es independiente de caveolina ⁽¹⁴⁾.

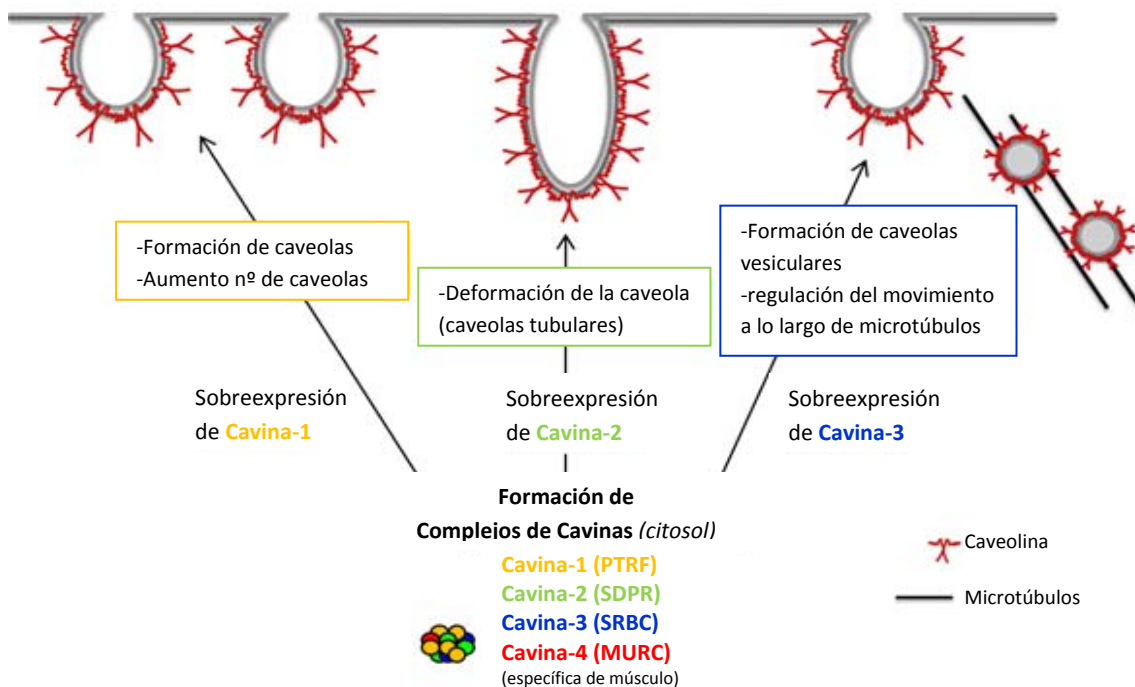


Figura I6: Dinámica de cavininas en la determinación de la estructura de las caveolas. Las caveolinas oligomerizan para formar el andamiaje de la caveola. Las cavininas forman complejos multiméricos en el citosol, que posteriormente se asocian a caveolas y determinan la forma final de la estructura. La sobreexpresión individual de cada cavinina tiene un efecto en la biogénesis, morfología y dinámica de las caveolas. Cavina-1 es necesaria para la formación de caveolas, y su sobreexpresión lleva al aumento del número de estas estructuras. Cavina-2 induce el alargamiento de las caveolas, mientras que cavina-3 provoca la formación de vesículas caveolares independientes. Cavina-4 constituye el componente específico de músculo de los complejos de cavininas (adaptado de ⁽²⁰⁾).

1.4.- Caveolina-1.

Como ya se ha comentado, Cav1 es un componente esencial para la formación de caveolas en diversos tipos celulares, como adipocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso y pneumocitos tipo I. Esta proteína tiene unas características estructurales específicas, que se reflejan en las diferentes funciones que presenta esta proteína.

1.4.1.- Estructura de Caveolina-1.

Cav1 es una proteína integral de membrana de 22-24 kDa que presenta una estructura de horquilla característica ^(139, 273), con un dominio central hidrofóbico transmembrana (residuos 102-122) que se inserta en la monocapa citosólica, dejando expuestos al interior celular los dominios N y C terminal (residuos 1-101 y 122-178 respectivamente), y por tanto accesibles para la interacción con proteínas citosólicas ^(59, 177). Esta estructura básica aparece también en Cav2 y Cav3.

El dominio N-terminal es el que presenta una mayor variabilidad en cuanto a su longitud y secuencia aminoacídica en el extremo N-terminal, tanto entre los tres tipos de caveolinas como entre especies ⁽¹³⁹⁾ (figura I5). Sin embargo, pueden encontrarse en esta región ciertos dominios altamente conservados, como un motivo de reconocimiento (*signature motif*, FEDVIAEP), con función desconocida hasta el momento, que aparece en todas las caveolinas y en todas las especies ⁽²²¹⁾, y el dominio de oligomerización (residuos 61-101), que es requerido para la formación de homo-oligómeros de caveolina ⁽¹⁷⁷⁾, y que a su vez contiene el dominio de “andamiaje” (CSD: *caveolin-scaffolding domain*) (residuos 82-101) que se ha postulado como necesario para muchas de las funciones de esta proteína (figura I7). En concreto, se ha propuesto este dominio CSD como necesario y suficiente para el anclaje de esta proteína a la membrana ⁽²⁴⁵⁾, así como para la interacción de caveolina con otras proteínas, permitiendo así su regulación y la modulación de diferentes rutas de señalización ^(17, 218, 243). Además, el CSD contiene una secuencia consenso que permite su unión a moléculas de colesterol ^(64, 151).

El dominio transmembrana (figura I7) de Cav1 no es requerido para el anclaje a la membrana ⁽²⁴⁴⁾, proceso dependiente del CSD, como ya se ha comentado, y en el que participan también residuos de cisteína del dominio C-terminal ⁽²⁶⁹⁾. No obstante, se ha descrito que el dominio transmembrana tiene un papel importante en la interacción específica con Cav2 y otras proteínas ⁽⁴⁵⁾.

En cuanto al dominio C-terminal, aparece bastante conservado en cuanto a su longitud. En este dominio se presentan tres cisteínas próximas a la región transmembrana (figura I7) que

están palmitoiladas irreversiblemente en Cav1 (residuos 133, 143 y 156) y Cav3 pero no en Cav2⁽⁵⁷⁾. Estas palmitoilaciones contribuyen al anclaje de la proteína a la membrana, así como a la unión de colesterol⁽²⁸⁸⁾, si bien estas funciones son más dependientes del CSD. Además, también están implicadas en la estabilización de oligómeros de caveolina, y por tanto de su estructura terciaria^(57, 176). Por último, estos residuos palmitoilados parecen regular la interacción de Cav1 con proteínas aciladas, como la subunidad α de proteínas G^(57, 79) o la tirosina-quinasa c-Src⁽¹⁴⁷⁾.

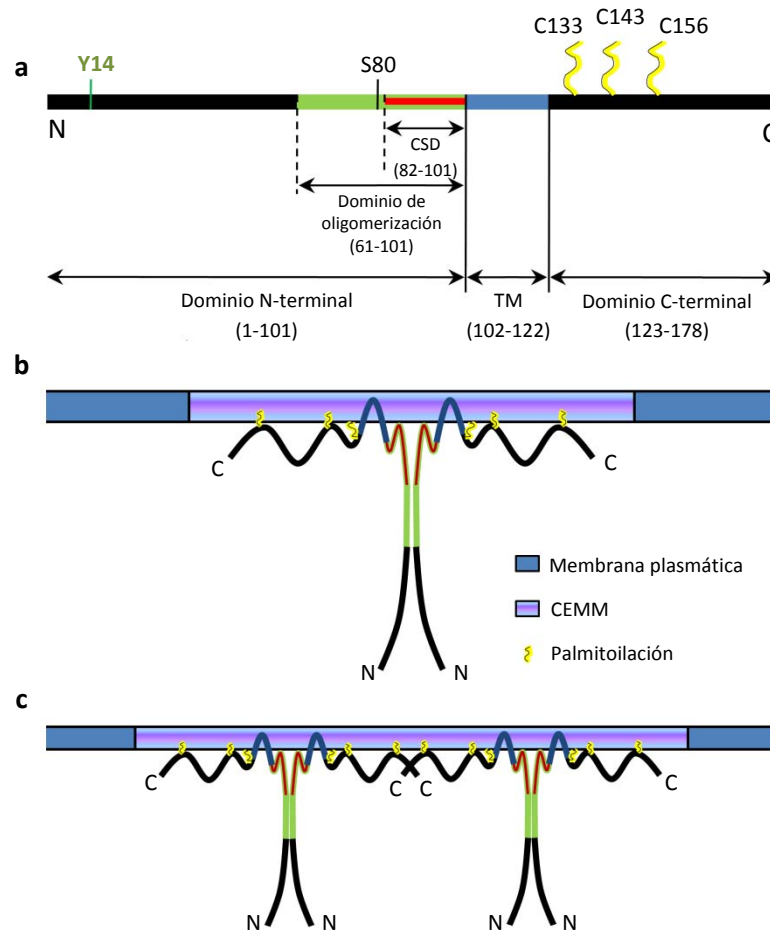


Figura 17. Estructura de Caveolina-1. **A:** Esquema de los dominios funcionales y estructurales identificados en Cav1. Se muestran los dominios N-terminal, C-terminal, transmembrana (TM, en azul), de oligomerización (verde) y CSD (rojo), así como los residuos fosforilables Y14 y S80, y los susceptibles de palmitoilación C133, C143 y C156. **B:** Oligomerización y anclaje a la membrana, en dominios ricos en colesterol y esfingolípidos altamente ordenados, de Cav1. En el anclaje a membrana intervienen los dominios transmembrana y las palmitoilaciones en cisteínas del dominio C-terminal, pero el dominio imprescindible para este anclaje es el CSD (en rojo). **C:** esquema de la estructura terciaria Cav1; los oligómeros interactúan gracias a su extremo C-terminal.

Además de estas palmitoilaciones en la región C-terminal, se han descrito otras modificaciones post-traduccionales en Cav1, como son la fosforilación en diferentes residuos de la región N-terminal, siendo las más importantes en los residuos tirosina-14 (Y14) y serina-80 (S80). La fosforilación en S80 está implicada en la unión de Cav1 a la membrana del retículo endoplásmico y la regulación de su entrada en la vía secretora⁽²⁴³⁾. Por otra parte, diversas

tirosina-quinastas fosforilan Cav1 en Y14, y esta fosforilación parece tener una función crucial en la modulación de diversas vías de señalización ^(27, 141, 153), estando implicada en la regulación de diversos procesos, como se verá más adelante. La fosforilación en Y14 sólo puede darse en la isoforma Cav1- α ⁽¹⁵³⁾, pero no en la β , posiblemente dando lugar a la diferente distribución y función de cada isoforma ⁽²⁷⁴⁾.

Es importante destacar que mientras que se han descrito ciertas fosforilaciones en Cav2, concretamente en las serinas 23 y 36 (implicadas en la modulación de la formación de caveolas Cav1- dependiente ⁽²⁷²⁾) y en las tirosinas 19 y 27 ⁽²⁹⁹⁾, estas modificaciones no se dan en Cav3.

Cav1 tiene la capacidad de formas homo-oligómeros de entre 200 y 400 kDa, compuestos por unos 14-16 monómeros ^(67, 237). Este fenómeno, que se da gracias al dominio de oligomerización presente en la región N-terminal ⁽¹⁷⁷⁾ (figura I7), comienza en el retículo endoplásmico ⁽²³⁷⁾, y después continúa en el aparato de Golgi ⁽²⁶⁹⁾. En este compartimento los oligómeros pueden interactuar por sus regiones C-terminales para dar lugar a complejos aún mayores, de unas 144 moléculas, que recubren y dan forma a la caveola ^(203, 230) (figura I7). También pueden formarse hetero-oligómeros de alto peso molecular compuestos por Cav1 y Cav2 ⁽²⁴⁰⁾. Sin embargo, Cav2 es incapaz de generar estos complejos en ausencia de Cav1, y depende de ella para su transporte a la membrana plasmática ^(178, 201). Cav3 puede formar también grandes complejos oligoméricos de aproximadamente 350-400 kDa ⁽²⁸³⁾. A pesar de que sus propiedades estructurales son similares a las de Cav1, Cav3 no forma complejos con Cav2 ⁽⁴⁵⁾.

1.4.2.- Funciones biológicas de Caveolina-1: transducción de señales.

Muchas de las funciones atribuidas a Cav1 se desprenden de su papel esencial en la formación de caveolas en tejidos no musculares. Así, se ha descrito que esta proteína interviene en el transporte de vesículas independientes de clatrina ^(221, 248), y en la homeostasis y transporte de colesterol a la membrana plasmática ^(75, 266). Además, dado que las caveolas han sido descritas como plataformas de membrana donde se compartimentan y concentran diversas moléculas de señalización ^(192, 256), se ha sugerido que Cav1 puede jugar un papel importante en la transducción de señales. No obstante, la modulación ejercida por Cav1 tiene lugar a distintos niveles, ofreciendo un alto grado de complejidad.

En un principio, se postuló que Cav1 actuaba como una proteína adaptadora, capaz de reclutar diversas moléculas de señalización a caveolas, gracias a su unión al CSD. No obstante, si bien esta interacción podría estabilizar su localización, se ha visto que, en la mayoría de los casos, la compartimentación de estas moléculas en las caveolas es debido a modificaciones

lipídicas, como palmitoilación, miristoilación o prenilación en dichas proteínas, más que a la presencia de Cav1^(153, 256, 267).

Sin embargo, una vez que, gracias a sus propiedades físico-químicas e interacciones lipídicas, las diversas moléculas de señalización se compartimentan en caveolas/CEMMs, Cav1 puede actuar modulando su actividad mediante diversos mecanismos.

1.4.2.1.- Regulación por interacción directa con el dominio CSD.

Se ha postulado que multitud de moléculas implicadas en la transducción de señales interaccionan de manera directa con Cav1 (tabla I2).

Tabla I2: Listado parcial de proteínas que potencialmente interaccionan con Cav1. En verde pálido se marcan aquellas proteínas que se unen a Cav1 fosforilada en Y14 (adaptada de^(139, 160, 256)).

| Receptores |
|--|
| β_2 AR (receptor β_2 adrenérgico) |
| AR (receptor de andrógenos) |
| EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidermal) |
| ErbB2- c-neu (receptor c-neu) |
| ER α (receptor α de estrógenos) |
| IR (receptor de insulina) |
| Receptor Hedgehog |
| TrkA (receptor del factor de crecimiento nervioso) |
| Receptor de neurotrofina p75 |
| PDGF-R (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas) |
| TGF β -R (receptor del factor de crecimiento transformante) |
| VEGF-R (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular) |
| Transductores de señales y efectores |
| AC (Adenilato ciclasa) |
| Btk (Bruton tirosina-quinasa) |
| Subunidades α de proteínas G |
| H-Ras |
| eNOS (sintasa endotelial de óxido nítrico) |
| nNOS (sintasa neuronal de óxido nítrico) |
| COX-2 (ciclooxigenasa-2) |
| PI3K (fosfoinositol-3 quinasa) |
| PKA (proteína quinasa A) |
| PKC (proteína quinasa C) |
| PLC (fosfolipasa C) |
| PLD1 (fosfolipasa D1) |
| Src- quinasas (Src, Fyn, Lck, Lyn, Yes) |
| Grb7 (proteína 7 de unión a receptor de factor de crecimiento) |
| Csk (c-Src tirosina-quinasa) |
| TRAF2 (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral α) |

En muchos de estos casos se ha propuesto que Cav1 ejerce una regulación por interacción directa de su dominio CSD con dominios de unión a Cav1 (CBD, *Cav-1 binding domain*) de estas proteínas ^(36, 37). En general, esta interacción tiene como resultado la inhibición de la actividad de dichas moléculas. Este es el caso de eNOS, cuya unión al CSD la mantiene inactiva hasta la llegada de un estímulo apropiado ⁽⁸⁰⁾, de c-Src, H-Ras ⁽¹⁵³⁾, la subunidad α de proteínas G ⁽¹⁵²⁾, PKA α ⁽²¹⁹⁾, y receptores de factores de crecimiento como EGFR ⁽³⁷⁾ y c-Neu ⁽⁶¹⁾, entre otros. Sin embargo, también se ha descrito que la unión al dominio CSD de Cav1 activa al receptor de insulina (IR) ⁽³²¹⁾. En todos los casos, esta interacción es dinámica y está estrechamente regulada ^(96, 183).

1.4.2.2.- Regulación por internalización de CEMMs/caveolas.

Otro mecanismo alternativo por el que Cav1 modula la transducción de señales está asociado a su papel en el tráfico de CEMMs. Como ya se ha comentado, en las caveolas se compartimentan multitud de moléculas de señalización, y es en estos dominios de membrana donde pueden interactuar con sus efectores y activar rutas de señalización determinadas.

Se ha descrito que la pérdida de adhesión a MEC mediada por integrinas conduce a una internalización de CEMMs, y la consiguiente terminación de rutas de señalización ⁽⁴⁸⁾. Este proceso es dependiente de Cav1 y de su fosforilación en la tirosina-14 ⁽⁴⁹⁾. La ausencia de Cav1, en células no adheridas a sustrato, restringe la internalización de CEMMs, a pesar de que la composición de éstos no se ve sustancialmente alterada ⁽⁵⁸⁾. Como consecuencia, se observa en estas células una hiperactivación de las vías Ras-MAPK, PI3K-Akt y Rac-PAK ⁽⁴⁹⁾, que están implicadas en múltiples procesos como son la progresión del ciclo y la supervivencia celular. Por tanto, mediante la regulación del tráfico de CEMMs, Cav1 puede modular indirectamente la transducción de señales, así como conectar la señalización dependiente de integrinas con las rutas de factores de crecimiento.

1.4.2.3.- Y14-fosfo-Caveolina-1 (Y14-p-Cav1).

Cav1 fue identificada originariamente como un sustrato de la pp60Src, la proteína transformante del virus del sarcoma de Rous, que la fosforila en su residuo Y14 ^(89, 90). Posteriormente, se describió que también podía ser fosforilada en este residuo por otras quinasas de la familia Src y Abl ^(1, 146, 153, 235, 236). Esta fosforilación se da en respuesta a diversos estímulos, como el anclaje de integrinas ^(212, 300), la estimulación con el factor de crecimiento epidermal (EGF), insulina y angiotensina II ^(132, 146), y choque osmótico y estrés celular ^(235, 236, 295).

Esto permite pensar que la fosforilación de Cav1 en Y14 es un paso intermedio en la transducción de señales. De hecho, se ha descrito que esta fosforilación permite la unión de proteínas que contienen dominios SH2, como Grb7^(146, 147) y Csk⁽²⁷⁾, lo que lleva a la activación de determinadas cascadas de señalización y a la regulación de diversos procesos.

Se ha descrito que esta fosforilación está implicada en la internalización de caveolas mediada por integrinas⁽⁴⁹⁾, como ya se ha comentado previamente. Además, Y14-p-Cav1 se localiza preferentemente en adhesiones focales, donde se da una intensa actividad tirosina-quinasa⁽¹⁴⁶⁾. Esto correlaciona con que la fosforilación en este residuo está implicada en el mantenimiento de dominios ordenados de membrana plasmática en adhesiones focales⁽⁸²⁾, así como en la renovación de estas estructuras⁽¹⁸⁶⁾. Igualmente está regulando la migración direccional⁽⁹⁵⁾ y la invasión tumoral local y distancia (metástasis)⁽⁹¹⁾.

Dada la compleja implicación de Cav1 en la transducción de señales, esta proteína regula multitud de procesos, entre los que cabe destacar la endocitosis, migración, proliferación y supervivencia celular, que se reflejan en los diversos fenotipos que presentan los ratones deficientes en Cav1, como se verá más adelante.

1.4.3.- Modelos murinos para el estudio de las caveolinas.

Puesto que las caveolinas parecen estar regulando una gran variedad de procesos celulares, se hacía necesaria la generación de modelos murinos deficientes en estas proteínas, como herramienta fundamental para su estudio a un nivel fisiológico y sistémico. Así, se generaron en primer lugar ratones deficientes en Cav3^(76, 100), seguidos de diversos modelos de ratones Cav1^{-/-}^(26, 58, 217, 325) y Cav2^{-/-}⁽²²⁰⁾, así como el doble KO Cav1/Cav3⁽²⁰⁰⁾. Lo más destacable del estudio de estos ratones es que la ausencia de Cav1 y Cav3, pero no de Cav2 provoca la pérdida de caveolas identificables en los tejidos que normalmente expresan estas proteínas. Estos ratones son viables y fértiles, lo que indica la existencia de mecanismos compensatorios que permiten la función celular en ausencia de caveolas y caveolinas. Sin embargo, un detallado análisis funcional e histológico revela múltiples alteraciones en estos ratones. En primer lugar, los ratones deficientes en Cav3 presentan diversos cambios miopáticos, asociados a distrofia muscular moderada y degeneración del músculo esquelético^(76, 100), así como cardiomiopatías moderadas⁽³¹⁴⁾. El fenotipo de los ratones Cav2^{-/-} es el más leve, presentando disfunciones pulmonares e intolerancia al ejercicio⁽²²⁰⁾. Las alteraciones encontradas en los modelos murinos deficientes en Cav1 se detallan en el apartado siguiente.

1.4.3.1- Ratones deficientes en Caveolina-1.

Diversos laboratorios generaron, de manera independiente, diferentes modelos de ratones $Cav1^{-/-}$, siguiendo estrategias distintas, ya fuera por la delección del exón 3⁽⁵⁸⁾, del exón 2⁽²⁶⁾, o de los dos primeros exones^(217, 325) (figura I8).

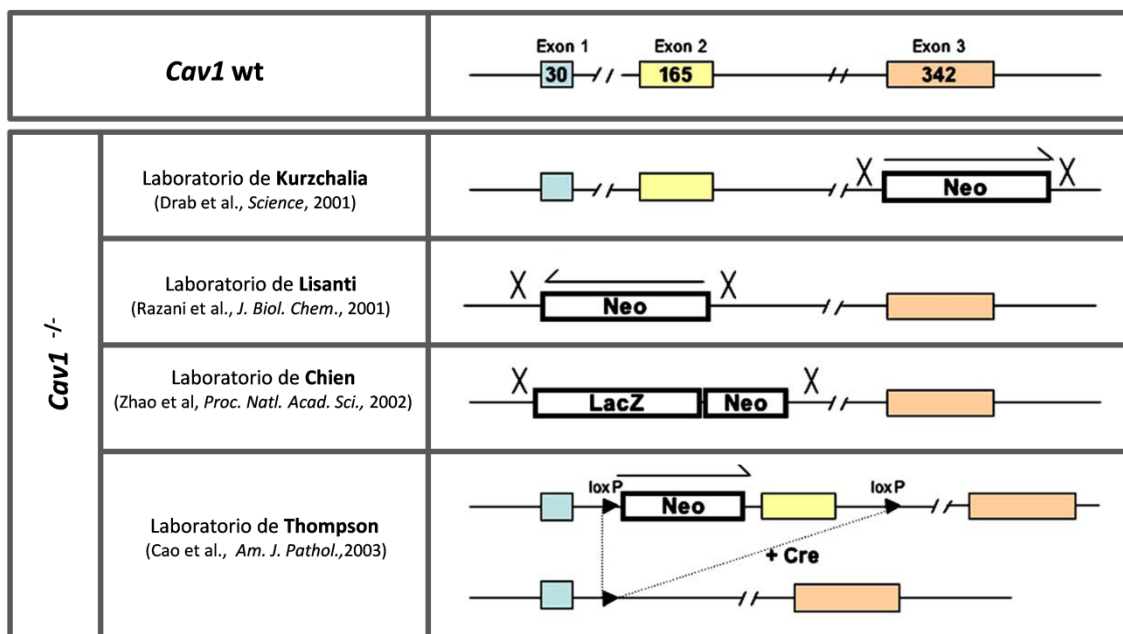


Figura I8: Generación de los diferentes ratones knockout de *Cav1*. Representación esquemática del locus genómico de *Cav1*, y de las diferentes construcciones usadas para generar los ratones $Cav1^{-/-}$. Se representa la disposición de los exones con cuadrados de diferente color, incluyendo el número de nucleótidos que componen cada exón. Los cuadrados en blanco representan la posición de la caja *Neo*, que codifica para el gen de la resistencia a neomicina, flanqueada por segmentos homólogos a los del locus y usada como selección positiva en el proceso de generación de los ratones. Se muestran las referencias a las publicaciones originales, así como el laboratorio de generación (adaptado de⁽¹⁴⁴⁾).

Como ya se ha comentado, estos ratones no presentan caveolas en tejidos no musculares, y son viables y fértiles. Sin embargo, se han descrito diversos fenotipos asociados a la ausencia de *Cav1* en estos animales (tabla I3).

Dada la complejidad estructural y funcional de *Cav1*, podría esperarse que los diferentes fenotipos encontrados respondieran a una o varias funciones asociadas a *Cav1*, ya sea por resultar imprescindible en la biogénesis de caveolas, o por su implicación en la homeostasis de colesterol, en el tráfico vesicular o en la transducción de señales. En esta última función, como ya se ha visto, existen diferentes vías de regulación, dependientes de los diferentes dominios y susceptibilidad de fosforilación de *Cav1*. Por tanto, dilucidar qué fenotipos son caveola-dependientes, así como el mecanismo por el que la ausencia de *Cav1* está provocando los diversos fenotipos resulta de una gran importancia.

Tabla I3: Fenotipos encontrados en los diferentes modelos de ratón *Cav1*^{-/-}. Se incluyen las referencias a los trabajos originales.

| | |
|--|------------------------|
| Ausencia caveolas | (58, 217, 325) |
| Disminución de la expresión de Cav2 | (217) |
| Viabiles y fértiles | (26, 58, 217, 325) |
| <i>Periodo de vida reducido (deficiencias cardiovasculares y pulmonares)</i> | (198) |
| Alteraciones lipídicas y metabólicas | |
| Más delgados y menor acumulación de grasa hipodérmica | (216) |
| Atrofia de adipocitos | (33) |
| Alteraciones en los cuerpos lipídicos | (33) |
| Alteración en la actividad lipolítica | (33) |
| Aumento en sangre de TG, FFA, quilomicrones y VLDL | (216) |
| Hiperplasia grasa parda | (216) |
| Resistencia a insulina | (34) |
| Ateroprotección (en fondo ApoE ^{-/-}) | (66, 70) |
| Alteraciones pulmonares (debidas a la disminución de Cav2) | (58, 217, 220) |
| Alteraciones en la regeneración hepática | (68, 172) |
| Alteraciones urogenitales | |
| Hiper calciuria y urolitiasis | (26) |
| Hipertrofia de la vejiga urinaria (músculo liso) | (313) |
| Agrandamiento de vesículas seminales (acumulación líquido) | (313) |
| Alteraciones en glándulas mamarias | |
| Desarrollo anormal (hiperplasia intraductal, engrosamiento) | (145, 271) |
| Producción láctea prematura | (199) |
| Alteraciones del sistema cardiovascular | |
| Miocardiopatía hipertrófica o dilatada | (32, 315, 325) |
| Hipertensión pulmonar | (325) |
| Aumento en la producción de NO | (58, 217, 325) |
| Disminución del tono miogénico | (5, 58) |
| Presión arterial normal | (5, 54, 205, 209, 229) |
| Remodelado arterial hipertrófico | (253) |
| Aumento en la respuesta α1- adrenérgica | (5, 184, 253) |
| Expansión del volumen plasmático | (5) |
| Aumento permeabilidad vascular | (155, 249) |
| Respuesta angiogénica alterada | (270, 312) |
| Alteraciones neurológicas | |
| Alteraciones emocionales, de la memoria espacial y la función colinérgica | (87) |
| Proliferación de células madre neuronales en el adulto | (126) |
| Supresor/promotor tumoral | |
| Aumento susceptibilidad tumorigénica | (28, 306, 308) |
| Retraso desarrollo cáncer próstata | (307) |
| Metástasis retardada | (91) |

1.4.3.2.- Alteraciones en el sistema cardiovascular de ratones *Cav1*^{-/-}.

1.4.3.2.1.- Fenotipo cardíaco.

Se han descrito múltiples alteraciones en el corazón de diferentes modelos *Cav1*^{-/-} (resumido en figura I9). Si bien en todos ellos aparecen cambios morfométricos, éstos difieren respecto al grosor de la pared y diámetro del ventrículo izquierdo (VI). En concreto, en el ratón generado por el grupo de Chien se observó, mediante ecocardiografía, un adelgazamiento de la pared posterior del ventrículo izquierdo (PPVI) y un diámetro diastólico aumentado, indicativo de una cardiomiopatía dilatada; además se observó un aumento de la proporción peso VI /peso corporal ⁽³²⁵⁾. En cambio, el ratón generado por el grupo de Lisanti presenta un engrosamiento de la PPVI y del septo interventricular, así como un diámetro diastólico reducido (visto por resonancia magnética) e hipertrofia del VI (por ecocardiografía), lo que se corresponde con una hipertrofia cardíaca ⁽³²⁾. También se observó un aumento de la proporción peso del corazón/peso corporal. En un tercer modelo, creado por el grupo de Kurzchalia, se describió una hipertrofia de ambos ventrículos (mediante observación histológica), así como un aumento en las proporciones peso VI /peso corporal y peso ventrículo derecho (VD)/ peso corporal ⁽³¹⁵⁾. Tanto en el ratón de Lisanti como en el de Chien se encontró una dilatación del VD ^(32, 325), que se corresponde con una hipertensión pulmonar ⁽³²⁵⁾, que no aparece en el ratón de Kurzchalia ⁽¹⁸²⁾.

En cuanto a la función cardíaca, se observó en todos los modelos una disfunción sistólica, tanto por técnicas ecocardiográficas como por medidas hemodinámicas indirectas ^(32, 315, 325). Además, en el ratón de Kurzchalia se observó una disfunción diastólica, ocasionada por alteraciones en la relajación del VI ⁽³¹⁵⁾.

En la mayoría de las cardiomiopatías se da una regresión hacia el programa fetal de expresión génica en el ventrículo. En concreto, el factor natriurético auricular (ANF, *atrial natriuretic factor*) aparece durante el desarrollo fetal en el ventrículo, pero tras el nacimiento su expresión se restringe a la aurícula. En los ratones deficientes en *Cav1* se encontró un aumento de la expresión de ANF en el ventrículo, lo que corrobora el desarrollo de una cardiomiopatía en ausencia de *Cav1* ^(32, 325).

En cuanto a los mecanismos subyacentes, el laboratorio de Lisanti observó, mediante estudios histológicos, una hipertrofia en los cardiomiocitos, así como una hiperplasia celular asociada a fibroblastos y fibrosis intersticial ⁽³²⁾. Además, describió que la ruta de Ras p42/44 MAPK estaba hiperactivada, y que esto podía explicar el fenotipo de hipertrofia cardíaca.

En los otros dos modelos, los autores tratan de explicar la cardiomiopatía encontrada por un aumento de la producción de óxido nítrico (NO), al estar desregulada la actividad de eNOS en

ausencia de Cav1^(315, 325). Además, se ha descrito que el fenotipo cardiaco es rescatado parcialmente al reconstituir la expresión de Cav1 específicamente en endotelio⁽¹⁸²⁾.

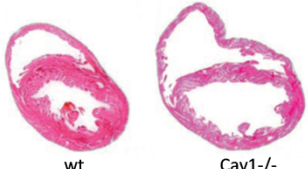
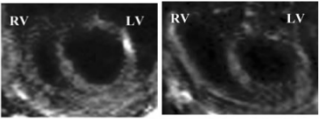

| <i>Ratón Cav1^{-/-} del laboratorio de Chien</i> | <i>Ratón Cav1^{-/-} del laboratorio de Lisanti</i> | <i>Ratón Cav1^{-/-} del laboratorio de Kurzchalia</i> |
|---|--|--|
| (edad: 5 meses)  wt Cav1 ^{-/-} <u>Cardiomiopatía dilatada</u> ↑ peso VI/corporal Adelgazamiento PPVI (eco) Dilatación VI (eco) Disfunción sistólica (eco) Dilatación VD (eco) Hipertensión pulmonar Expresión ANF <i>Mecanismo:</i> activación eNOS Zhao, PNAS, 2002 | (edad: 2 - 4 meses)  RV LV RV LV wt Cav1 ^{-/-} <u>Hipertrofia cardiaca</u> ↑ peso corazón /corporal Engrosamiento PPVI, SV (RM) Disminución diámetro VI Disfunción sistólica (eco) Dilatación VD (RM) Expresión ANF Fibrosis <i>Mecanismo:</i> activación vía 42/44 MAPK Cohen, AJP Cell Physiol., 2003 | (edad: 2-12 meses)  wt Cav1 ^{-/-} <u>Hipertrofia cardiaca</u> ↑ peso VI-VD/corporal Hipertrofia de VI y VD (hemodinámica) Disfunción sistólica y diastólica Fibrosis <i>Mecanismo:</i> activación eNOS Wunderlich, BBRC, 2006 Murata, J Exp Med, 2007 |

Figura I9: Fenotipos cardiacos encontrados en los diferentes ratones deficientes en Cav1. En diferentes colores se destacan los fenotipos coincidentes en diferentes modelos. Entre paréntesis se indica la técnica de análisis utilizada. RM: resonancia magnética; eco: ecocardiografía. PPVI: pared posterior del ventrículo izquierdo. SV: septo ventricular. VI: ventrículo izquierdo. VD: ventrículo derecho. ANF: factor natriurético auricular.

Las diferencias encontradas en los corazones de los diferentes ratones Cav1^{-/-} pueden tratar de explicarse por el diferente fondo genético y la edad de los ratones, así como por las técnicas de estudio empleadas⁽¹⁴⁴⁾. No obstante, el fenotipo cardiaco en estos ratones parece ser bastante complejo, respondiendo a la regulación de diferentes rutas en diferentes tipos celulares. Tradicionalmente se ha asumido que, en el corazón, la expresión de Cav1 estaba restringida a las células endoteliales y fibroblastos, y que la única caveolina expresada en el cardiomiocito era Cav3. Sin embargo, estudios recientes apuntan a una posible expresión de Cav1 en células musculares cardiacas^(43, 110, 205), si bien sigue habiendo controversia en este punto. Además, se sabe que también pueden aparecer cardiomiopatías secundarias, como consecuencia de una disfunción sistémica. Por ejemplo, un aumento en la activación del sistema renina-angiotensina II- aldosterona (SRAA) está asociado a hipertrofia cardiaca⁽³⁰⁵⁾. Dado que el receptor de angiotensina II (AT1) está regulado por Cav1^(121, 317), podría darse el caso de que la desregulación de este receptor en ausencia de Cav1 estuviera también implicada en este fenotipo. Por tanto, aún se necesita profundizar más en el estudio de la implicación de Cav1 en

el fenotipo cardíaco, dada la complejidad de los mecanismos susceptibles de regulación de éste, y las múltiples vías de actuación de Cav1.

1.4.3.2.2.- Otros fenotipos cardiovasculares.

Un factor clave en la regulación del sistema cardiovascular es el NO. Esta molécula regula funciones cruciales como la vasodilatación, el tono miogénico y la contractilidad estimulada⁽²⁸⁷⁾. Se ha descrito una hiperproducción de NO en diversos modelos de ratón Cav1^{-/-} (58, 217, 325), como consecuencia de la desregulación de la actividad eNOS. En concordancia con esto, se observa un tono miogénico arterial reducido en estos ratones^(5, 58), lo que apunta a una posible reducción de la presión arterial. No obstante, diversos estudios en estos ratones han demostrado que su presión arterial no está afectada^(5, 54, 205, 209, 229), lo que lleva a pensar en la existencia de mecanismos que compensen los efectos de la hiperproducción de NO.

Entre otros efectos compensatorios, se ha encontrado que existe un remodelado arterial hipertrófico en estos ratones⁽²⁵³⁾, así como una respuesta neurogénica α 1- adrenérgica aumentada^(5, 184, 253) y una expansión del volumen plasmático⁽⁵⁾, lo que conduce a un control efectivo de la resistencia vascular, y a la constatación de que Cav1 está regulando el sistema cardiovascular a diversos niveles y mediante diferentes mecanismos.

1.4.3.3.- Papel de Cav1 en la progresión tumoral.

Se ha descrito que Cav1 funciona como un regulador negativo de la transformación tumoral. Los genes que codifican para Cav1 y 2 se encuentran en el locus humano 7q31 (en el 6-A2 en ratones), región que está frecuentemente alterada en células tumorales, y que por tanto es susceptible de contener genes supresores tumorales⁽⁶³⁾. También se han encontrado mutaciones en el gen de Cav1 en el 16% de los cánceres de mama (P132L)^(108, 306), y otros muchos tumores humanos presentan niveles reducidos de Cav1⁽³⁰⁷⁾.

Además, la expresión de Cav1 está disminuida en células NIH3T3 transformadas por los oncogenes V-abl, Bcr-abl y Ras, así como en muchas células tumorales^(138, 148, 304, 324). La reintroducción de Cav1 es suficiente para revertir el crecimiento independiente de adhesión y la transformación en estas células^(62, 324). Además, el silenciamiento de Cav1 en células NIH3T3 conduce a la hiperactivación de la vía Ras-p42/p44 MAPK, así como a un aumento de su capacidad de crecimiento independiente de adhesión y de formación de tumores *in vivo*⁽⁷⁷⁾.

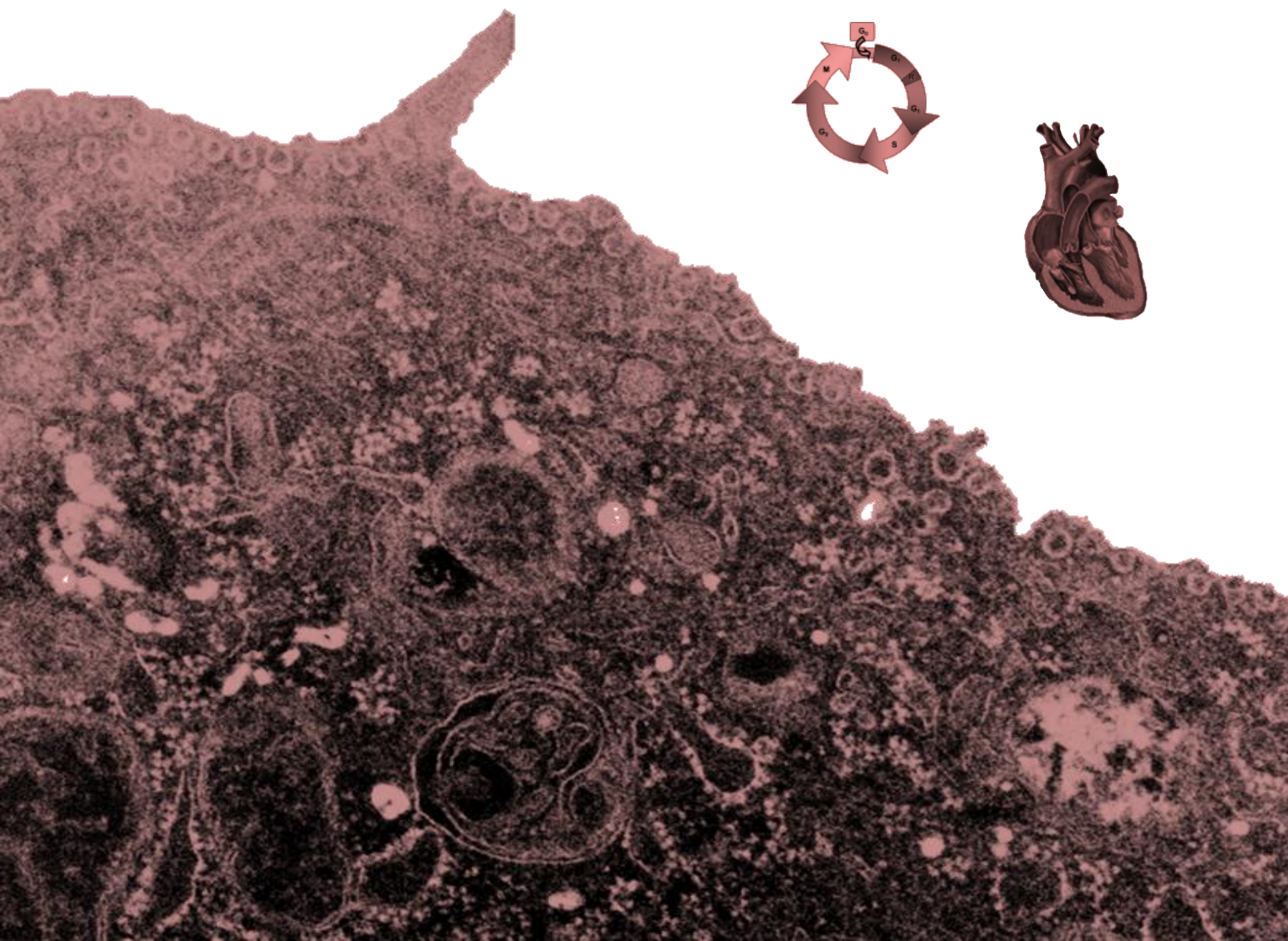
El estudio en ratones deficientes en Cav1 ha revelado que, si bien no presentan formación de tumores espontáneos, sí se observa en ellos una mayor susceptibilidad tumorigénica. De hecho, células derivadas de estos ratones exhiben una mayor tasa de proliferación⁽²¹⁷⁾, y además se ha

visto que existe una hiperplasia en el epitelio de la glándula mamaria de estos animales ^(145, 311). Asimismo, los ratones Cav1^{-/-} presentan una dramática aceleración de la tumorigénesis cuando son cruzados con ratones transgénicos que expresan el antígeno T de polioma en la glándula mamaria (MMTV-PyM) ⁽³⁰⁶⁾, y exhiben una mayor susceptibilidad para la formación de tumores inducidos en piel mediante tratamientos químicos carcinogénicos ⁽²⁸⁾. Por tanto, esto parece indicar que Cav1 no es un potente supresor tumoral *in vivo*, pero su ausencia coopera y potencia otros factores adicionales para el desarrollo tumoral en estos ratones ⁽²⁹⁾.

A pesar de todas estas evidencias que avalan el papel de Cav1 como supresor tumoral, múltiples trabajos muestran que también puede actuar como un promotor tumoral. Se ha encontrado un aumento de la expresión de Cav1 en carcinomas de próstata ^(150, 189, 280, 286), vejiga ⁽²¹⁴⁾, y de células escamosas en esófago ⁽¹³⁰⁾, y de células no- pequeñas de pulmón (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) ⁽²⁷⁷⁾.

Esto indica que los efectos de Cav1 en tumorigénesis son dependientes del tipo de tejido y del estadio del tumor. De hecho, la expresión de Cav1 aparece disminuída en la mayoría de los tumores primarios, lo que puede conferir a las células la capacidad de AIG y resistencia a *anoikis*, mientras que su expresión aumenta en los cánceres más agresivos, particularmente aquellos refractarios a tratamientos hormonales y quimioterapia, y aquellos que presentan una mayor invasividad y metástasis ⁽²⁵⁵⁾. En estos tumores, la expresión elevada de Cav1 se da principalmente en las células del estroma, favoreciendo el potencial migratorio y metastásico de las células tumorales ⁽⁹¹⁾.

2.- OBJETIVOS



1.-

Caracterización del papel de Cav1 en la regulación de la proliferación celular.

2.-

Determinación del papel de Cav1 en la regulación de la supervivencia y progresión del ciclo celular dependiente de adhesión por integrinas.

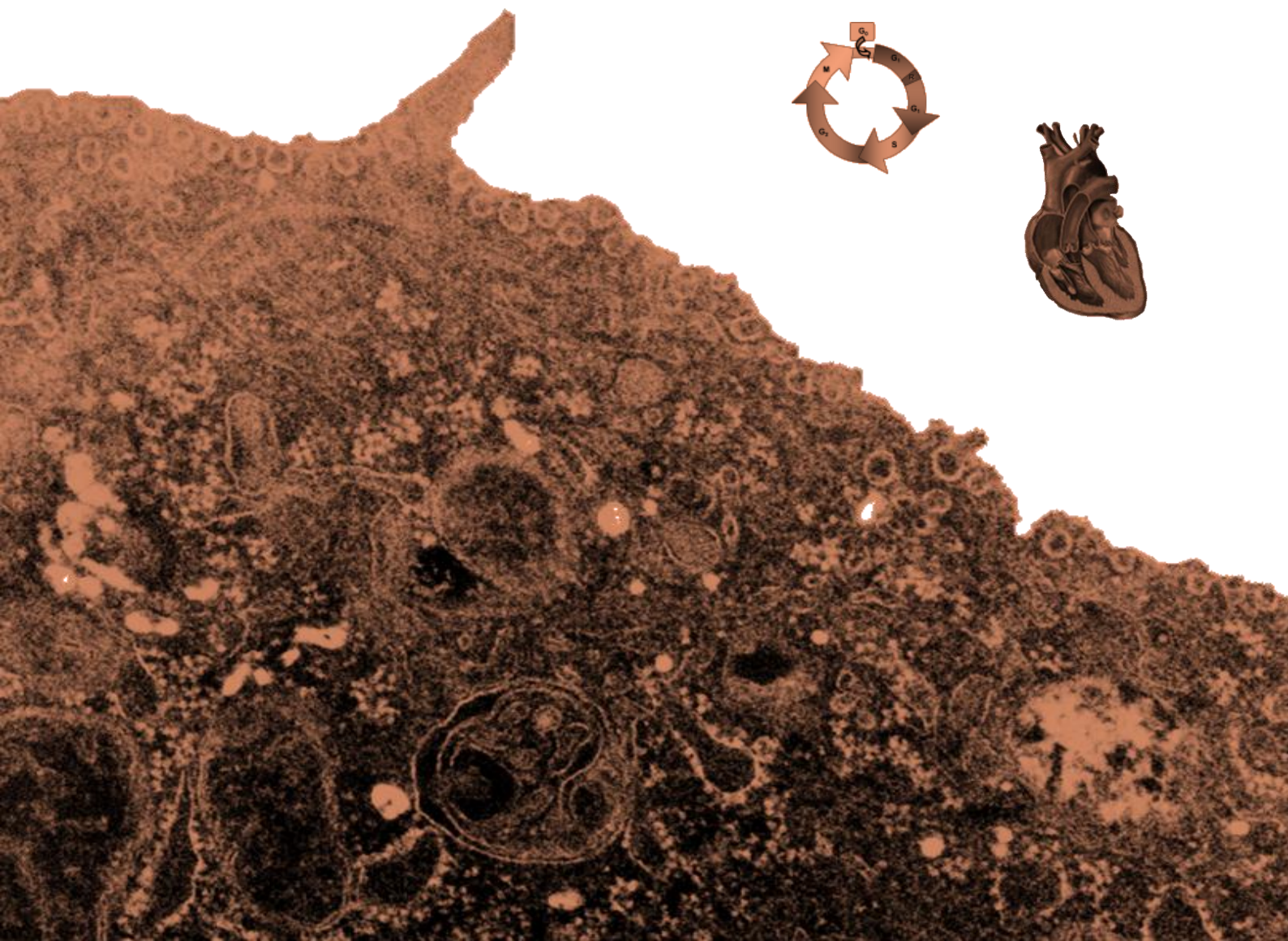
3.-

Generación y validación de un nuevo modelo *Knock-in* de ratón que expresa una forma mutada de Cav1 no fosforilable en su Y14 (Cav1^{Y14F}), para la determinación del papel de esta fosforilación *in vivo*, así como de un nuevo modelo *Knock-out* funcional de Cav1.

4.-

Caracterización del fenotipo cardíaco de los nuevos ratones generados.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS



3.1.- Reactivos y anticuerpos.

Los anticuerpos primarios usados en este trabajo, así como su procedencia, aparecen reflejados en la siguiente tabla.

Tabla MM1: Anticuerpos primarios. Se indica la casa comercial, así como su referencia.

| Anticuerpo | Procedencia |
|--|---|
| anti- γ -tubulina (monoclonal) | <i>Sigma-Aldrich</i> (T-4026) |
| anti-p70S6K (policlonal) | <i>Cell Signaling Technology</i> (9202) |
| anti-fosfo-p70S6K ^{T389} (monoclonal) | <i>Cell Signaling Technology</i> (9234) |
| anti-fosfo-Akt ^{S473} (monoclonal conejo) | <i>Biosource International</i> (44-622) |
| anti-fosfo-Akt ^{T308} (policlonal) | <i>Cell Signaling Technology</i> (9275) |
| anti-Akt (policlonal) | <i>Cell Signaling Technology</i> (9272) |
| anti-GSK3 β (policlonal) | <i>Cell Signaling Technology</i> (9315) |
| anti-fosfo-Erk ^{pTpY185/187} (policlonal) | <i>Biosource International</i> (44-680G) |
| anti-Erk 1/2 pan (policlonal) | <i>Biosource International</i> (44-654G) |
| anti-caveolina-1 (policlonal) | <i>BD Pharmingen</i> (610060) |
| anti-caveolina-1-XP (monoclonal conejo) | <i>Cell Signaling Technology</i> (3267) |
| anti-caveolina-2 (monoclonal) | <i>BD Pharmingen</i> (610685) |
| anti-ciclina D1 (monoclonal) | <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (sc-8296) |
| anti-ciclina A (policlonal) | <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (sc-751) |
| anti-pRb (monoclonal) | <i>BD Pharmingen</i> (554136) |
| anti-fosfo-pRb ^{S807/811} (policlonal) | <i>Cell Signaling Technology</i> (9308) |
| anti-p107 (policlonal) | <i>Abcam</i> (ab 2451-1) |
| anti-p130 (policlonal) | <i>Abcam</i> (ab 6545-100) |
| anti-p27 (policlonal) | <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (sc-528) |
| anti-CDK4 (monoclonal) | <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (sc-260) |
| anti-FOXO3a (policlonal) | <i>Upstate/Millipore</i> (07-702) |
| anti-Rac1 (monoclonal) | <i>Upstate/Millipore</i> (clone 23A8; 05-389) |
| anti-HA (hemaglutinina) (monoclonal) | <i>Covance</i> (MMS-101P) |
| anti-myc (monoclonal) | <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (clone 9E10; sc-40) |
| anti-PTRF (monoclonal conejo) | Sobrenadante hibridoma Awc-C1 (cedido por R.G. Parton) |
| anti-BrdU conjugado Alexa-594 (monoclonal) | <i>Molecular Probes</i> (A21304) |
| anti-fosfo-histona H3 (policlonal) | <i>Millipore</i> (06-570) |
| anti-fosfo-tirosina (clon 4G10) (monoclonal) | <i>Upstate/Millipore</i> (05-321) |
| anti-aerolisina (monoclonal) | <i>Protox Biotech</i> |
| anti-receptor de transferrina (CD71) (policlonal) | <i>Santa Cruz Biotechnology, Inc.</i> (sc-9099) |

El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con el fluoróforo Alexa 488, y el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 594, así como la faloidina marcada con Alexa 647 y la subunidad B de toxina colérica conjugada con Alexa 594 (CTxB-594), fueron proporcionados por *Molecular Probes*. Los anticuerpos secundarios de cabra, anti-IgG de ratón y de conejo, conjugados con peroxidasa HRP (*horseradish peroxidase*), provenían

de *Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc.* La proaerolisina se obtuvo de *Protox Biotech*, mientras que el compuesto *Hoechst 33342* fue proporcionado por *Sigma-Aldrich*.

Las bolas de látex (poliestireno- divinilbenzeno) de 5 μm fueron servidas por *Duke Scientific Corporation*, y la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) fue obtenida de *Calbiochem*.

El medio de cultivo DMEM y el suero fetal bovino fueron proporcionados por *Gibco*. Los antibióticos penicilina y estreptomicina eran de *Bio-Whittaker*, mientras que los antibióticos neomicina (G418) y doxiciclina se compraron a *Sigma-Aldrich*.

Los inhibidores de la fosforilación de Erk y de PI3K fueron, respectivamente, U0126 y LY294002 de *Calbiochem*, mientras que el inhibidor de GSK3 β , LiCl, así como el dimetilsulfóxido (DMSO) fueron obtenidos de *Sigma-Aldrich*.

Tanto el reactivo de transfección de ADN, *Lipofectamina*, como el usado para la transfección de oligonucleótidos, *Oligofectamina*, fueron servidos por *Invitrogen*.

El medio de montaje utilizado fue Permafluor, de *Thermoscientific*.

3.2- Cultivos celulares.

3.2.1.- Líneas celulares.

En este trabajo se han utilizado fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) immortalizados por el método 3T3, derivados de ratones wt y Cav1^{-/-}, ambos procedentes de dos colonias independientes: **MEF-R wt y Cav1^{-/-}** ⁽²¹⁷⁾, cedidos por el Dr. Michael P. Lisanti (*Thomas Jefferson University*, Filadelfia, EEUU), y **MEF-D wt y Cav1^{-/-}** ⁽⁵⁸⁾, cedidos por el Dr. Lucas Pelkmans (*University of Zürich*, Suiza). Además, se utilizaron **MEF-R Cav1^{-/-} reconstituídos** establemente con un vector vacío, con un vector para la expresión de Cav1 y con un vector que contenía la forma no fosforilable Cav1^{Y14F} ⁽⁹⁵⁾. Los **MEFs PTRF^{-/-}**, derivados de ratones PTRF^{-/-} ⁽¹⁵⁸⁾ fueron cedidos por el Dr Robert G. Parton (*Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland*, Australia).

Por otra parte, se usaron **fibroblastos tímicos (TFs)** ⁽²⁸⁹⁾ procedentes de ratones wt y Cav1^{-/-}, cedidos por el Dr. Richard G.W. Anderson (*University of Texas*, EEUU), así como TF Cav1^{-/-} que expresan Cav1 de manera estable (**RC-TFs**).

También se utilizaron preadipocitos 3T3L1 con un silenciamiento estable de Cav1 (**3T3L1-hcCav1 y sus controles**), generados por infección retroviral de un vector que expresa un ARN interferencia para Cav1 o una secuencia control (*scramble*) ⁽⁹²⁾. Estas células fueron cedidas por el Dr. Albert Pol (*Intituto de Investigaciones Biomédicas IDIBAPS*, Barcelona) y la Dra. Marta Camps (Universidad de Barcelona).

Tanto los MEFs como los preadipocitos 3T3L fueron cultivados en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂.

La línea celular de melanoma humano, **M21L**, así como las células **M21L-Cav1**, que expresan Cav1-GFP de forma estable, fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂, en medio DMEM suplementado con 10% de FBS; para las células M21L-Cav1 se añadió 0,5mg/ml de neomicina (G418) como antibiótico de selección⁽⁴⁹⁾.

Finalmente, se usaron las líneas de fibroblastos de rata **Rat1 RacV12**, que expresa establemente la forma activa RacV12, y **Rat1V8**, que expresa un vector vacío. Estas células fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de FBS, 0,5mg/ml de neomicina (G418) y en presencia o ausencia de 2µg/ml de doxiciclina⁽⁵¹⁾, a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂.

Para los ensayos de *sincronización y entrada en ciclo celular* se procedió a la *privación de suero*, manteniendo las células durante 72h en DMEM suplementado con 0,1% FBS, 100 U/ml de penicilina y 100µg/ml estreptomycin. Después las células fueron *estimuladas* mediante la adición de suero (cambio del medio de privación por DMEM 10% FBS) y se fueron recogiendo a distintos tiempos después de la estimulación, por tripsinización y lavados con PBS mediante centrifugación.

Para los ensayos en *suspensión*, las células se sembraron en placas de plástico no adherente recubiertas de una fina capa de agarosa al 0,5%, durante 18h. De manera alternativa, para los ensayos de incorporación de BrdU e internalización de CEMMs, las células se sembraron en suspensión en medio DMEM con 0,5% de metilcelulosa y 2 µM HEPES, en constante rotación. En ambos casos, el medio fue suplementado con 10% FBS.

3.2.2.- Cultivos primarios.

3.2.2.1.- Extracción y cultivo de MEFs primarios.

En este estudio se han utilizado también MEFs primarios aislados a partir de embriones wt y Cav1^{-/-}, así como de embriones wt, Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y}, de las nuevas estirpes creadas.

Para ello, se extrajeron embriones de 13,5 días, se desechó la cabeza, hígado y corazón, y se disgregó el tejido mecánicamente y mediante digestión con 0,05% tripsina durante 5 min a 37°C. Posteriormente se utilizaron 25ml de medio DMEM suplementado con 10% FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), para inactivar la tripsina y resuspender las células, que, a continuación, fueron sembradas en placas de 250mm, a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂. Los MEFs primarios utilizados en este trabajo presentaban un pase < 5.

3.2.2.2.- Células madre embrionarias de ratón (ES).

Además se utilizaron células madre embrionarias de ratón del *clon R1 (129X/SvJ x 129S1)* para la estrategia de generación de las nuevas estirpes murinas. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 15% FBS, 2mM l-glutamina, piruvato 1mM y aminoácidos no esenciales, a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂.

3.3.- Ensayos de incorporación de BrdU.

La síntesis de ADN en MEFs se analizó directamente por la incorporación del análogo de base 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, *Sigma Aldrich*). Células en adhesión o suspensión se cultivaron durante 16h, tras las cuales se añadió BrdU al medio a una concentración de 50µM, durante 2h. Posteriormente, las células fueron recogidas y fijadas para su tinción por inmunofluorescencia indirecta. En el caso de los ensayos de retención de CEMMs en membrana con bolas recubiertas con toxina colérica, el tratamiento de BrdU fue de 5h.

3.4.- Ensayos de crecimiento en agar blando.

MEF-R y TFs wt, Cav1^{-/-} y Cav1^{-/-} reconstituídos establemente con Cav1 (1,5x10⁴ células por genotipo) se resuspendieron en 3ml de medio completo 2x (20% DMEM 10x; 20% FBS; 8µg/ml ácido fólico; 7mM glucosa; 7mg/ml NaCO₃; 4mM L-glutamina, 200 U/ml de penicilina y 200µg/ml estreptomicina) y se mezclaron con 3ml de agarosa al 0,7%, a 39°C. La mezcla se sembró sobre una capa de agar al 0,5% (1ml agar 1% mezclado con 1ml de medio completo 2x) y se permitió que las células se asentaran en la interfase durante 20 min a 37°C. Posteriormente, tras la solidificación a temperatura ambiente, se añadieron a cada pocillo 2 ml de medio completo 1x, que se fue cambiando cada 3 días. Tras 3 semanas de incubación a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂, se tiñeron las colonias con 0,005% cristal violeta (*Merck*) durante 1h, para ser fotografiadas y proceder a su recuento.

3.5.- Curva de crecimiento.

MEFs primarios wt y Cav1^{Y/Y} fueron sembrados a una densidad de 5x 10⁵ células, en placas de 60mm, y cultivados en medio DMEM suplementado con 10% FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂. Las células fueron levantadas y resembradas en los días 3, 6 y 10, y contadas mediante el uso de una cámara de conteo *Neubauer*.

3.6.- Ensayo de formación de focos.

MEF-R wt y Cav1^{-/-}, sembrados a una densidad de 5x10⁵ células en placas de 30mm, fueron co-transfectados con vectores que codifican el oncogen humano H-Ras y la proteína GFP (para valorar la eficiencia de transfección), respectivamente. Tras ser cultivados durante 10 días a 37°C en una atmósfera humedecida al 5% CO₂, se tiñeron con 0,005% cristal violeta durante 1h, para el recuento de los focos formados.

En el caso de los MEFs wt y Cav1^{-/-} primarios, las células fueron transfectadas con el vector codificante para el oncogen H-Ras, o co-transfectadas con plásmidos que contenían H-Ras y el oncogen E1A.

3.7.- Análisis de la apoptosis y el ciclo celular por citometría de flujo.

Las células fueron recogidas mediante tripsinización y centrifugación, y posteriormente fijadas con etanol 70% a 4°C. Después fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en una solución de PBS que contenía 0,5mg/ml de RNasa y 20 µg/ml de yoduro de propidio (*Sigma-Aldrich*). Más tarde se analizó el ciclo celular de un total de 10.000 células por punto, usando el citómetro de flujo *FACS Canto II (BD)*. Las fases G0/G1, S y G2/M, así como la fase sub-G0/G1 (indicativo de células apoptóticas) se cuantificaron con el *software FACS-Diva*.

3.8.- Inhibición farmacológica.

Para los ensayos de inhibición farmacológica de la vía p42/44 MAPK, se utilizó el inhibidor de la fosforilación de Erk, U0126, a una concentración de 10µM en el medio de cultivo durante la sincronización y estimulación por suero, en un caso, y durante la suspensión en otro.

La inhibición química de PI3K se realizó mediante el uso del inhibidor específico LY294002 a 50µM, y para la inhibición de GSK3β se empleó el inhibidor LiCl (40mM), en el medio de cultivo en suspensión. En todos los casos, se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como control, por ser el disolvente de los inhibidores.

3.9.- Plásmidos de expresión.

- **pEGFP-C1:** plásmido que codifica para GFP (*Clontech*). En este trabajo se ha utilizado como vector vacío control, y para cuantificar la eficacia de transfección en el ensayo de formación de focos.
- **pEGFP-Rac-G12V:** Construcción que codifica para la forma mutante constitutivamente activa RacV12 fusionada a GFP. Su clonaje a partir del vector pEGFP-C1 fue previamente descrito ⁽⁵³⁾.

- ***pEGFP-Rac-T17N***: Este plásmido contiene la mutación dominante negativa RacN17 fusionada a GFP. Fue clonado a partir del vector pEGFP-C1⁽⁵³⁾.
- ***pEGFP-RhoA-G14V***: Construcción codificante para la forma mutada dominante negativa RhoV14 fusionada a GFP. También se clonó a partir del vector pEGFP-C1⁽⁵³⁾, como en los casos anteriores.
- ***pEGFP-Δp85***: Este vector, que fue clonado a partir de pEGFP-C1⁽²⁹¹⁾, contiene un mutante por delección de p85, la subunidad reguladora de PI3K.
- ***pEGFP-N1-Cav1***: este plásmido codifica Cav1 fusionada a GFP en su extremo C-terminal (GFP-Cav1). Fue clonado a partir del vector pEGFP-N1⁽¹⁹⁷⁾ y cedido por la Dra Marie O. Parat (*School of Pharmacy, University of Queensland, Australia*).
- ***pcDNA3-myr-HA-Rac***: construcción que contiene la secuencia de Rac fusionada a la secuencia de miristoilación de Src, para su translocación a membrana, marcada con el epítipo hemaglutinina (HA). Este vector fue clonado a partir del vector pcDNA3, como se describió en trabajos previos⁽⁵¹⁾.
- ***pcDNA3-IL2-HA-Rac***: plásmido que codifica la secuencia de Rac fusionada a la secuencia de la región transmembrana del receptor de interleucina-2 (IL-2), marcada con el epítipo hemaglutinina (HA). Clonado a partir del vector pcDNA3⁽⁵¹⁾.
- ***pcDNA3-p110-CAAX***: vector que contiene la secuencia de la subunidad catalítica de PI3K (p110α) fusionada a una secuencia de translocación a membrana, comportándose como un mutante constitutivamente activo. Esta construcción fue clonada a partir de pcDNA3⁽²⁹¹⁾.
- ***pBR/SV40-H-Ras***: codifica el oncogen humano H-Ras (cedido por el Dr. Marcos Malumbres (CNIO, Madrid)).
- ***pCMV-E1A-12S***: contiene el oncogen E1A (cedido por el Dr. M Malumbres (CNIO, Madrid)).

3.10.- Transfecciones transitorias.

Los plásmidos *pBR/SV40-H-Ras* y *pCMV-E1A-12S* fueron transfectados transitoriamente utilizando el reactivo *Lipofectamina*, según las indicaciones de la casa comercial (para el ensayo de formación de focos).

El resto de vectores fueron electroporados para su expresión transitoria usando cubetas de 4mm (*BTX*) y el electroporador *ECM830* de *BTX*, siendo las condiciones de electroporación de 350V durante 10ms.

3.11.- Infección adenoviral.

Cultivos de MEF-R casi confluentes fueron privados de suero, en DMEM-BSA durante 12h. Pasado este tiempo, se añadieron al medio adenovirus codificantes para *LacZ* (como control) o RacN17 (cedido por la Dra. Anne Ridley (*Ludwig Institute for Cancer Research, University College, Londres*)) a una multiplicidad de infección de 300, y se incubó durante toda la noche. Al día siguiente, se reemplazó el medio por DMEM-BSA fresco, y las células fueron incubadas durante otras 24h, para completar el protocolo de privación de suero ⁽¹³⁶⁾.

3.12.- Silenciamiento de Rac, Akt y GSK3β.

Para silenciar tanto *Rac* como *Akt* en MEF-R Cav1^{-/-} se utilizaron ARNi específicos (100nM), de secuencia 5'- CAGACAGACGUGUUCUAAUUGCU-3'⁽¹²⁷⁾ y 5'- CCTGCCCTTCTACAACCAGGA-3'⁽¹⁴⁹⁾ y un ARN de secuencia truncada (“*scramble*”) como control, obtenidos de *Invitrogen*. Estos ARNi fueron transfectados, usando el reactivo *Oligofectamina*, 24h antes de cultivar las células en suspensión.

El vector *mU6pro* codificante para el ARNhc de secuencia 5'- TAAGAACCGAGAGCTCC-3' se utilizó para silenciar *GSK3β* en MEF-R wt, usando el plásmido vacío como control (cedido por el Dr. Dave Turner (*University of Michigan, EEUU*)) ⁽³²³⁾. Este vector fue electroporado 24h antes de comenzar el cultivo en suspensión de las células.

3.13.- Ensayos de retención de CEMMs en membrana.

Bolas de 5 μm de látex fueron lavadas con PBS e incubadas con 10 μg/ml de anticuerpo contra el receptor de transferrina (anti-TfR) o con 10 μg/ml de la subunidad B de la toxina colérica (CTxB), de unión a GM1, durante toda la noche a 4° C. Se incubaron células en adhesión con las bolas recubiertas y lavadas con PBS frío, a una proporción célula:bola de 1:40, durante 1h. Transcurrido ese tiempo, se despegaron las células y se pusieron en suspensión en medio con metilcelulosa en constante rotación durante 12h. Después se añadió BrdU (50μM) al medio durante 5h, y se recogieron las células mediante lavados con PBS frío y centrifugación.

3.14.- Cuantificación de la internalización de GM1 en suspensión por microscopía.

MEFs wt y Cav1^{Y/Y} primarios fueron tripsinizados y lavados con PBS frío. Posteriormente se incubaron con CTxB conjugada con Alexa-594 durante 30min a 4°C, para permitir su unión al GM1 de membrana plasmática, pero impedir su internalización. Después se lavaron las células con PBS frío y se pusieron en suspensión en medio con metilcelulosa durante los tiempos requeridos.

Tras ser recogidas y fijadas, se procedió a la tinción de la membrana plasmática con la lectina de germen de trigo (WGA, *wheat germ agglutinin*) conjugada con el fluoróforo Alexa 488. Esta tinción se utilizó para delimitar la membrana plasmática en las imágenes captadas, dibujando una máscara exterior (intensidad total) y otra interior (intensidad citoplasmática), de las cuales se calcula la intensidad del canal rojo, correspondiente a la CTxB-594. Finalmente, la intensidad de CTxB en membrana plasmática se obtiene restando la intensidad del canal rojo de la máscara interior a la exterior, normalizado respecto a la intensidad total. Esta cuantificación se realizó usando el programa *ImageJ*. Se cuantificaron un mínimo de 15 células por punto.

3.15.- Cuantificación de GM1 no internalizada en suspensión por microscopía.

En este caso, se pusieron las MEFs wt y PTRF^{-/-} en suspensión en medio con metilcelulosa. A los tiempos requeridos, las células se lavaron con PBS frío y centrifugación suave, y posteriormente fueron incubadas con CTxB conjugada con Alexa-594 durante 30min a 4°C, para permitir la unión al GM1 de membrana plasmática que no haya sido internalizado. Posteriormente, se recogen y fijan las células para su análisis por microscopía.

Utilizando el programa *ImageJ*, se delimita la membrana plasmática como en el apartado anterior, utilizando la propia tinción de CTxB como marcador de membrana, ya que esta molécula no es capaz de atravesar membranas biológicas *in vivo*, marcando tan solo GM1 de membrana plasmática. La intensidad de CTxB a tiempo 2h se normalizó respecto a la del tiempo 0. Se cuantificaron un mínimo de 15 células por punto.

3.16.- Extracción y cuantificación de proteínas.

Células previamente tripsinizadas, lavadas con PBS y recogidas por centrifugación fueron rápidamente congeladas a -80° C. Los *pellets* se lisaron con tampón de lisis RIPA (10mM Tris HCl pH 7,2; 150mM NaCl; 0,1% Triton X-100; 0,1% SDS; 0,1% SDC; 5mM EDTA), conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa (1µg/ml aprotinina; 1µg/ml leupeptina; 0,5mM Na₃VO₄; 20mM NaF).

Tras su clarificación por centrifugación, se determinó la concentración de proteína por el método de *Bradford* (con el reactivo de *DC Protein Assay*, de *Bio-Rad*), y se calculó el volumen necesario para 5-40µg de proteína.

3.17.- Inmunodetección (*Western-blot*).

Las distintas muestras de proteína se desnaturalizaron a 95°C en tampón Laemmli, se fraccionaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (7,5 y 12% de acrilamida) en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Hybond C, Amersham Pharmacia, Biotech.*). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en una solución de leche en polvo desnatada al 5% en PBS 0,1% Tween-20, excepto para detectar proteína fosforilada, en cuyo caso el bloqueo se realizó con 3% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS-Tween.

A continuación, las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos correspondientes disueltos en solución de bloqueo. Después de lavar las membranas con PBS-Tween, fueron finalmente incubadas durante 1h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa HRP, que sirvieron para visualizar los primarios mediante una reacción de quimioluminiscencia, usando los reactivos ECLTM (*GE Healthcare-Amersham*).

El análisis densitométrico se realizó utilizando el *software QuantityOne*. El resultado se expresa en unidades arbitrarias.

3.18.- Ensayos de determinación de la actividad Rac-GTPasa.

La actividad basal de Rac se cuantificó mediante ensayos de arrastre (*pull-down*)⁽⁵¹⁾, utilizando el dominio de unión a Rac de la proteína PAK (PBD, *PAK binding domain*), fusionados a la enzima glutatión S-transferasa (GST).

Brevemente, monocapas subconfluentes de MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron privadas de suero durante 72h como se ha descrito. Después, las células fueron enfriadas en hielo, lavadas con PBS frío y lisadas en un tampón que contenía 0,5% NP-40, 50mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 10% glicerol, 1mM PMSF, 1µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina y 20 µg de GST-PBD recombinante. Los lisados se incubaron con bolas de glutatión-sefarosa durante 30 min a 4°C, se lavaron con tampón de lisis y se eluyeron hirviendo en tampón de carga Laemmli-SDS. La cantidad de Rac unido (Rac-GTP) se analizó por *Western-blot*. También se analizó la cantidad de Rac en el lisado total para normalizar los niveles de Rac activo.

3.19.- Tratamiento con pervanadato e inmunoprecipitación de Cav1.

MEFs wt, Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y} primarios fueron sembrados en semiconfluencia en una placa de 10cm y posteriormente incubados durante 1h en presencia o ausencia de pervanadato sódico 1mM (ortovanadato sódico activado con H₂O₂ diluida 1:1000, durante 30min). Después las células fueron recogidas mediante tripsinización, lavadas con PBS y lisadas usando 500µl de

tampón de lisis RIPA antes descrito, conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados se incubaron con bolas agarosa conjugada con proteínas G y A durante toda la noche a 4°C, en presencia de anticuerpo anti-Cav1 policlonal. Al día siguiente se lavaron con tampón de lisis y se eluyó la Cav1 retenida mediante ebullición en tampón de carga Laemmli-SDS. La cantidad de Cav1 fosforilada se analizó por *Western-blot*, usando el anticuerpo anti- fosfo-tirosina (clon 4G10). También se analizó la cantidad de Cav1 total.

3.20.- Extracción de ARN, reacción de reversotranscripción y PCR cuantitativa.

El ARN total se extrajo con el kit *Absolutely ARN* (Stratagene), a partir del cual se sintetizó el ADN complementario usando el kit *Omniscript RT kit* (Qiagen). La reacción de PCR cuantitativa se hizo en el termociclador *Sequence Detection Systems ABI 7000* (Applied Biosystems) usando *SYBR-Green kit* (Roche Diagnostics GmbH) y las parejas de oligonucleótidos cebadores específicos, mostrados en la tabla MM2. La fluorescencia fue medida al final de cada ciclo de alargamiento. Tras la amplificación, los productos de PCR fueron confirmados mediante el análisis de la curva de disociación. El análisis de resultados se realizó con el programa *qBase plus 1.0*.

Tabla MM2: Oligonucleótidos usados para PCR cuantitativa. Se muestra la temperatura de anillamiento.

| Gen | Oligonucleótido cebador | | Tª anillamiento |
|---|-------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Ciclina D1 (ratón) | <i>Directo</i> | 5'- TGCCATCCATGCGGAAA-3' | 60°C |
| | <i>Inverso</i> | 5'- AGCGGGAAGAACTCCTCTTC-3' | 60°C |
| CDK4 (ratón) | <i>Directo</i> | 5'- GGCCTTTGAACATCCCAAT-3' | 60°C |
| | <i>Inverso</i> | 5'- TCAGTTCGGGAAGTAGCACAGA-3' | 60°C |
| Myh6 (MHC- α) (ratón) | <i>Directo</i> | 5'- CCACTGTGGTGCCTCGTTC-3' | 59°C |
| | <i>Inverso</i> | 5'- GCGTCCGTCATTCTGTCACTC-3' | 59°C |
| Myh7 (MHC- β) (ratón) | <i>Directo</i> | 5'- AGGGCCTGAATGAGGAGTAGC-3' | 59°C |
| | <i>Inverso</i> | 5'- TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAG-3' | 59°C |
| GAPDH (ratón) | <i>Directo</i> | 5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' | 59°C |
| | <i>Inverso</i> | 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' | 59°C |

Los niveles de ARNm de ciclina D1 fueron normalizados respecto a los de CDK4, que no se ven afectados por las condiciones de cultivo. Asimismo, los niveles ARNm de MHC- α y MHC- β se normalizaron respecto a los de GAPDH.

3.21.- Inmunofluorescencia y microscopía confocal.

Las células se cultivaron en adhesión sobre cristales, en las condiciones indicadas. Después se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Cuando se indica, las células fueron cultivadas en suspensión (placas de agar o medio con metilcelulosa), recogidas y fijadas con PFA al 4%, lavadas con PBS y adheridas a un portaobjetos de cristal mediante centrifugación (*Shandon Cytospin 4, Thermo*).

Tras la fijación y los lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PBS con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 15 min para reducir las uniones inespecíficas. Para el caso de las tinciones de BrdU, se aplicó un paso adicional de desnaturalización de ADN con HCl 2N durante 25 min. Los lavados siguientes e incubaciones con faloidina, Hoechst, WGA y anticuerpos primarios fueron hechos en PBS con 0,2% de BSA durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpos secundarios se usaron anti IgG de ratón y conejo, conjugados con Alexas fluorescentes, también en medio de bloqueo, durante 1h a 37°C. Tras el marcaje, se montó la preparación en *Permafluor* y se adquirieron las imágenes con el objetivo 63x, y 40x para el marcaje de BrdU, usando el microscopio *confocal SPE* de *Leica*.

Para las tinciones de Cav1 en corazón, cortes de 5µm fueron rehidratados, y se procedió al desenmascaramiento del antígeno mediante ebullición en tampón citrato 10mM (pH 6) durante 20 min. Posteriormente, se bloquearon los cortes en PBS-BSA 1% durante 30 min, y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Cav1 (monoclonal) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras lavar los cortes con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 594, y Hoechst para marcar los núcleos. Tras el marcaje, se montó la preparación en *Permafluor* y se adquirieron las imágenes con el objetivo 20x y 63x usando el microscopio *confocal SPE* de *Leica*.

3.22.- Generación de los ratones Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y}.

3.22.1.- Generación del vector para la recombinación homóloga.

Para generar el vector pMG19 se siguieron varios pasos. En primer lugar, se amplificaron, a partir de la secuencia genómica del locus *129s7/AB2.2 cav1*, los fragmentos de ADN de 5074 pb (“fragmento izquierdo”), que contenía el promotor, el exón 1 y una secuencia “*upstream*” (“corriente arriba”), de *cav1* de ratón, y el fragmento de 3005 pb (“fragmento derecho”) que contenía el exón 2 y el intrón 2 de *cav1*. El ADN de la secuencia genómica fue obtenido de la biblioteca comercial *Mouse bMQ BAC library* (*Sanger Institute*), clon bMQ-313O11. Se añadieron a los extremos 5' y 3' los sitios de restricción *Not I* y *Sal I*, en el caso del fragmento izquierdo, y *Xba I* y *Kpn I*, para el fragmento derecho, durante la reacción de amplificación,

mediante el uso de cebadores específicos (tabla MM3) y el uso del kit *Expand High Fidelity PCR System (Roche)*. Cada fragmento fue independientemente subclonado en un vector *pGEM-T easy (Promega)* y secuenciado para su verificación.

Posteriormente, se procedió a la mutagénesis dirigida del fragmento derecho, para sustituir el codón *TAC* (correspondiente a la tirosina en posición 14 de la proteína) por *TTC* (que codifica para fenilalanina), usando el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene)*, y oligonucleótidos cebadores específicos (tabla MM3). El fragmento resultante fue verificado por secuenciación.

Tabla MM3: Secuencias de los oligonucleótidos cebadores usados para la amplificación de los fragmentos izquierdo y derecho, y para la mutagénesis dirigida. En negrita y entre paréntesis aparecen las dianas de restricción introducidas, así como el codón mutado.

| | Oligonucleótido cebador | |
|--|-------------------------|--|
| Amplificación del fragmento izquierdo | Directo | 5'-GGGCCC GCGGCCGC AGCCTGCATGTCTCTGTGGTTC-3' (<i>Not I</i>) |
| | Inverso | 5'-GCGCGC GTCGAC CACCTGCTCCGTGGTCCCTCTC-3' (<i>Sal I</i>) |
| Amplificación del fragmento derecho | Directo | 5'-GGGCCC TCTAGA TACAGAGGAGGAGGAACGGGAACC 3' (<i>Xba I</i>) |
| | Inverso | 5'-GCGCGC GGTACC CACCTGTGGGGGAGAGTAAATAAA-3' (<i>Kpn I</i>) |
| Mutagénesis dirigida (TAC→TCC) | Directo | 5'-CCTCACAGGGACATCTC TTC ACTGTTCCCATCCGGG-3' |
| | Inverso | 5'-CCCGGATGGGAACAGT GAA GAGATGTCCCTGTGAGG-3' |

Una vez obtenidos los fragmentos izquierdo y derecho modificado, se procedió a su clonaje en el vector pBH48⁽²¹⁵⁾, derivado del plásmido pPNT, que contiene una caja PGK-neo-stop flanqueada por sitios *LoxP* (lo que permite su escisión por recombinación mediada por Cre), así como diversos codones de terminación, y el gen codificante para la resistencia a neomicina, bajo el promotor constitutivo de la fosfoglicerato-quinasa (PGK). Además, este vector contiene el gen para la timidina quinasa (TK) bajo el promotor PGK, que confiere susceptibilidad a la droga ganciclovir, lo que es usado como marcador de selección negativa.

El clonaje de los fragmentos izquierdo y derecho en el vector pBH48 se realizó secuencialmente en dos etapas: primero se insertó el fragmento izquierdo, en los sitios de restricción *Not I* y *Xho I* (que genera extremos cohesivos compatibles con *Sal I*) de pBH48; posteriormente, se clonó en el sitio *Kpn I* de este vector intermediario el fragmento derecho. De esta manera, se consigue que la caja PGK-neo-stop quede flanqueada por los dos fragmentos de genoma de ratón (figura MM1), lo que facilitará la recombinación homóloga en el genoma murino. Este proceso de recombinación homóloga conlleva la delección de un fragmento de secuencia intrónica de 175pb.

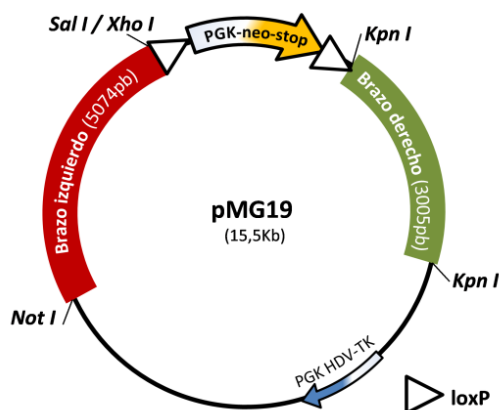


Figura MM1: Esquema del vector de recombinación pMG19. En rojo se muestra el fragmento izquierdo, que codifica para el promotor, exón 1 y secuencias en 5' de *cav1*, mientras que en verde aparece el fragmento derecho, que contiene el exón 2 modificado y el intrón 2 de *cav1*. Se indica la posición de la caja PGK-neo-stop y PGK-HDV-TK (que codifica para timidina quinasa, confiriendo susceptibilidad a ganciclovir, usado como selección negativa). Se marcan los sitios de restricción usados para el clonaje.

3.22.2.- Inserción por recombinación homóloga y selección de células ES positivas.

Una vez generado el vector pMG19, fue digerido con la enzima de restricción *Not I* para linealizarlo, y se electroporó en células madre embrionarias (células ES, “*Embryonic Stem cells*”) de ratón, clon R1 (*129X/SvJ x 129S1*), siendo las condiciones de electroporación de 10^7 células con una concentración de $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN a 250V y $500\mu\text{F}$.

A las 24h, se añadió a las células el antibiótico de selección positiva, neomicina ($0,5\text{mg}/\text{ml}$, G418), durante 8 días. Transcurrido este tiempo, se aislaron los clones positivos y se les añadió ganciclovir ($2\mu\text{M}$) durante 5 días, para realizar la selección negativa, que informó de posibles recombinaciones no homólogas. Se seleccionaron finalmente 442 colonias.

3.22.3.- Confirmación de la recombinación homóloga por Southern blot.

El ADN genómico de los diferentes clones seleccionados fue extraído por lisis celular (tampón Tris-HCl 100mM pH 8,5, EDTA 5mM , $0,2\%$ SDS, 200mM NaCl y $100\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinasaK) y precipitación de ADN con isopropanol. Posteriormente, el ADN genómico se digirió con la enzima de restricción *EcoRV* y se cargó la digestión en un gel de agarosa, para la separación de los diferentes tamaños electroforéticamente. A continuación, se sumergió el gel en HCl $0,25\text{N}$ durante 15 min y se aclaró con agua destilada. Después se desnaturalizó el ADN mediante la inmersión del gel en NaOH $0,4\text{N}$ durante 40min. El ADN se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente (*Genescreen Plus*®, *Perkin Elmer*), mediante transferencia alcalina por capilaridad. Al día siguiente se lavó la membrana con tampón 2xSSC (sodio-citrato salino) y se inmovilizó el ADN en la membrana por entrecruzamiento inducido por UV.

Para hibridar la sonda complementaria, marcada radiactivamente con $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ (mediante el kit comercial *Amersham Rediprime II DNA Labeling System*, *GE Healthcare*), se bloqueó la

membrana en tampón de hibridación (dextran-sulfato en presencia de ADN de espermatozoos de Salmón (2mg/ml)) durante 4h a 65°C. Después se incubó con la sonda complementaria marcada (5-10ng/ml), durante toda la noche a 65°C en tampón de hibridación. Al día siguiente se lavó la membrana en tampón SSC- 0,1%SDS y se reveló usando placas de autorradiografía y el escáner Storm 820 GE.

3.22.3.1.- Obtención de la sonda complementaria

Se amplificó por PCR una sonda de ADN de 845pb, a partir de ADN genómico 129s7/AB2.2, utilizando oligonucleótidos específicos. (tabla MM4). Esta sonda se encuentra a 490pb del extremo 3' del fragmento derecho.

Tabla MM4: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la sonda complementaria.

| | Oligonucleótido cebador | |
|---|-------------------------|--------------------------------|
| Amplificación de la sonda complementaria | Directo | 5'-AATTATGCTCCCCTCCCCACTT -3' |
| | Inverso | 5'- GCTCCTACTGAATTTGCTCTAT -3' |

3.22.4.- Generación de blastocistos quiméricos.

Células ES positivas fueron microinyectadas (figura MM2) en blastocistos obtenidos de hembras hormonadas para conseguir superovulación, de fondo genético C57/BL6 (Harlan), en una proporción de 12-15 células ES por blastocisto. A continuación, los blastocistos quiméricos fueron implantados quirúrgicamente en hembras pseudogestantes (previamente puestas en cruce con machos vasectomizados).

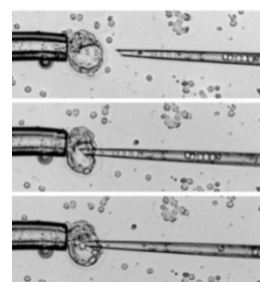


Figura MM2: Diferentes etapas de microinyección (adaptado de ⁽²²²⁾).

3.22.5.- Obtención de ratones quiméricos y selección de transmisores.



Figura MM3: Ratón quimérico. Se muestra el pelaje de dos colores: negro (fondo C57/BL6 (H)), y agoutí (derivado de células ES).

Al término de la gestación, se obtuvieron ratones quiméricos, que fueron identificados por el color del pelaje (figura MM3): porciones negras, derivados de células C57/BL6 (H) del blastocisto receptor, y partes agoutíes, derivadas de las células ES (clon R1) microinyectadas.

Para seleccionar aquellas quimeras capaces de transmitir la modificación genética generada, se cruzaron con ratones wt C57/BL6 (H). Las crías descendientes con pelaje agoutí fueron genotipadas por PCR, siendo seleccionadas las crías “+/f” como fundadoras de la colonia Cav1^{f/f}.

3.22.6.- Escisión de la caja PGK-neo-stop.

Ratones *Cav1^{fl/f}* fueron cruzados con hembras *Sox2-Cre*. Esta Cre recombinasa es de expresión epiblastica, por lo que se expresa en la línea germinal y células somáticas de todos los descendientes. De esta manera, se consiguieron ratones *Cav1^{+Y/+Cre}*, en los que la caja PGK-neo-stop ha sido escindida, generándose el alelo para la expresión de *Cav1^{Y14F}*.

Los ratones *Cav1^{+Y/+Cre}* fueron cruzados con hembras wt *C57/BL6 (H)*, siendo el 25% de la descendencia *Cav1^{+Y}*.

3.23.- Genotipado y comprobación de la escisión por PCR.

El reconocimiento de los diferentes alelos de *cav1* se realizó por PCR, utilizando los cebadores indicados en el figura MM4, siendo las condiciones de la reacción 95°C /5min, 35 ciclos de 95°C/ 1min -56°C/ 1min - 72°C 1min20s y 72°C/ 7min, usando el kit *RedExtract-N-Amp Tissue PCR (Sigma-Aldrich)*. Para los alelos *cav1-wt* y *cav1-Y14F* se utilizó la misma pareja de cebadores, dado que difieren en 101 pb debido la estrategia de clonaje.

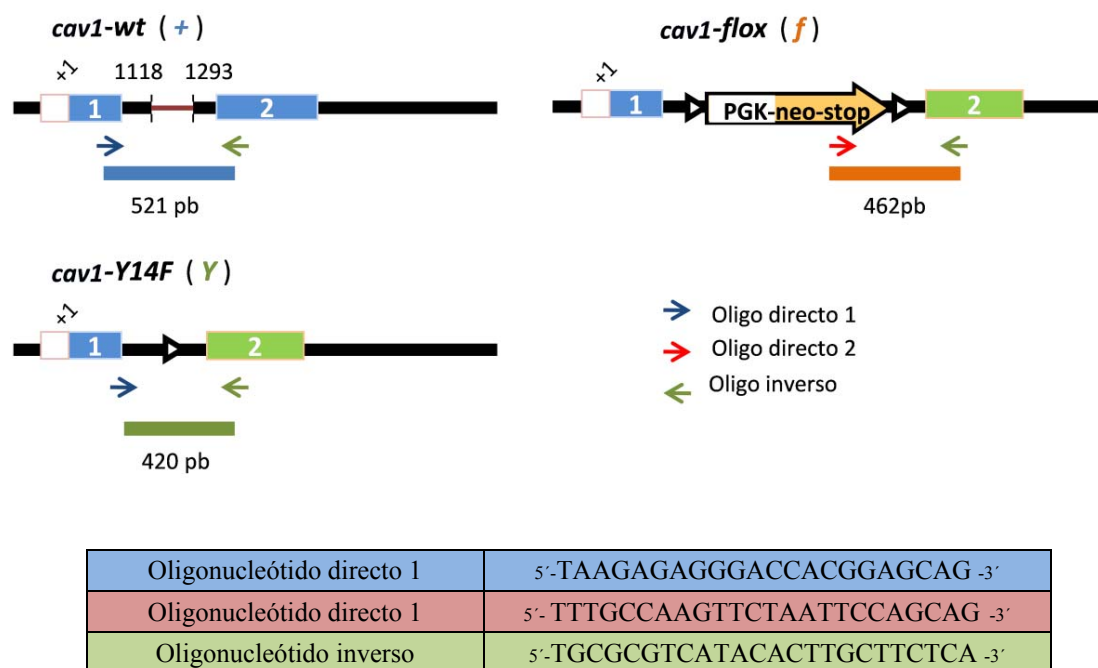


Figura MM4: Esquema de los oligonucleótidos cebadores usados para el genotipado por PCR. Para amplificar los fragmentos correspondientes a *cav1-wt* (521pb) y *cav1-Y14F* (420pb) se utilizan los mismos cebadores, hibridando el “directo 1” en el exón 1 y el “inverso” en el exón 2. Para la amplificación del fragmento correspondiente a *cav1-flox* (462pb), se utiliza un cebador “directo 2” que hibrida en la secuencia de la caja PGK-neo-stop, y el mismo inverso que en los casos anteriores. Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

3.24.- Mantenimiento de los ratones.

Ratones *Cav1*^{-/-} (de la cepa *Cav1tm1Mls/J*) y sus correspondientes controles fueron obtenidos de *Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)*.

Los ratones *C57BL/6 (H)* fueron obtenidos de *Harlan Animal Research Laboratory*.

Los ratones de la cepa *Sox2-Cre*, para la escisión de la caja PGK-neo-stop, fueron cedidos por el Dr. Miguel Torres (*CNIC*, Madrid).

Las nuevas estirpes de ratones generadas fueron *Cav1*^{ff} y *Cav*^{Y/Y}, como se ha descrito previamente.

El mantenimiento de todos estos animales se realizó siguiendo la normativa de la Unión Europea, de acuerdo a las recomendaciones de FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*): fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar (2018 Teklad global, *Harlan Interfauna Ibérica S.L.*) y se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se realizaron periódicamente controles de seguimiento sanitario, en los que consta la ausencia de todo organismo patógeno.

3.25.- Extracción y procesamiento de órganos de ratón.

A las edades indicadas, los animales fueron eutanasiados por inhalación de CO₂, y se extrajeron los diversos órganos.

Para la posterior extracción de ADN genómico, se congelaron rápidamente los tejidos a -80°C.

Para realizar cortes y tinciones de corazón, una vez extraído, este órgano fue fijado en formalina 10% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se procedió a su deshidratación e inclusión en parafina, en el procesador de tejidos *Leica ASP300*, y se cortaron secciones de un grosor de 5µm con ayuda de un microtomo *Leica RM2245*. Estas cortes fueron recogidos sobre portaobjetos recubiertos de polilisina, y rehidratados realizando lavados seriados con xilol, etanol 100%, etanol 90%, etano 70% y agua.

Posteriormente, en uno de los cortes seriados se realizó una tinción de hematoxilina-eosina para comprobar la estructura e integridad del tejido, según el procedimiento estándar.

3.26.- Ecocardiografía transtorácica y electrocardiografía.

Los estudios de ecocardiografía transtorácica y electrocardiografía se realizaron en ratones anestesiados, en posición supina, con la ayuda del ecocardiógrafo *VEVO 1200 (VisualSonics)* y un transductor de 30MHz.

Se depiló la zona torácica del animal, utilizando crema depilatoria no irritante, manteniendo al animal sujeto en todo momento para evitar su ingestión. Transcurridos 5 minutos se aclaró con agua templada para evitar irritaciones. Posteriormente se indujo la anestesia en cámara con sevoflurano. Una vez comprobado que el animal estaba inconsciente se pasó a la plataforma del ecocardiógrafo, precalentada a 37°C para evitar la hipotermia, y se aplicó la anestesia con máscara, reduciendo el flujo. El animal fue sujetado con cinta adhesiva por las extremidades, que permanecieron en contacto con unos electrodos, para el registro electrocardiográfico continuo de la derivación II, y la posterior medición de la duración del intervalo “QRS”.

Con el animal anestesiado y sujeto de la forma descrita, se procedió al estudio ecocardiográfico, midiendo los parámetros a continuación descritos. El proceso duró en total entre 5-10 min por animal, tras el cual se cerró el suministro de anestésico en la máscara y se permitió la recuperación del animal, facilitada por aporte de oxígeno.

A partir de la adquisición de imágenes en un plano paraesternal eje corto en modo M (figura MM5), se midieron los espesores de la pared posterior del ventrículo izquierdo (PPVI), y septo interventricular (SIV), así como el diámetro del VI en telediástole ($Diam_d$) (punto de máxima dimensión de la cavidad) y en telesístole ($Diam_s$), a partir de los cuales se calculó la fracción de acortamiento ($FA = 100 \times (Diam_d - Diam_s) / Diam_d$).

Para el cálculo de la fracción de eyección se empleó el método de Teichholz. Este método permite calcular los volúmenes telediastólico y telesistólico mediante las siguientes fórmulas:

-Volumen diastólico (Vol_d) = $[7 / (2,4 + Diam_d)] \times Diam_d^3$;

-Volumen sistólico (Vol_s) = $[7 / (2,4 + Diam_s)] \times Diam_s^3$.

A partir de éstos, se calculó la de la fracción de eyección ($FE = 100 \times (Vol_d - Vol_s) / Vol_d$).

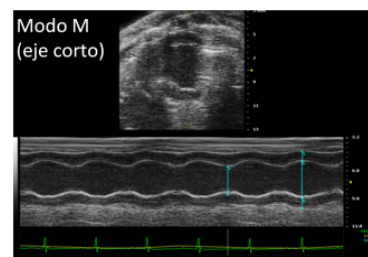


Figura MM5: Imágenes adquiridas en modo M(eje corto).

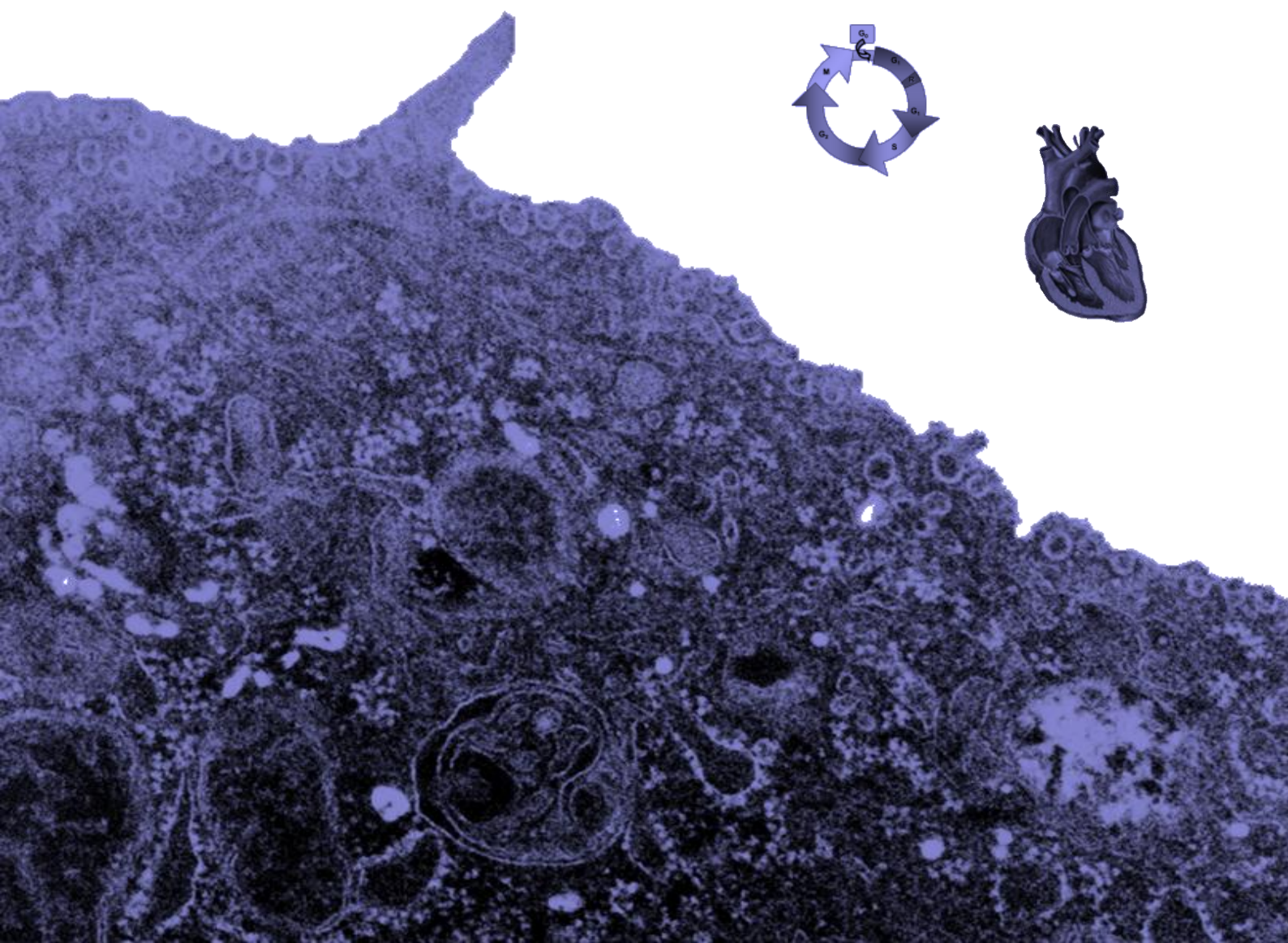
3.27.- Cuantificación del área de los cardiomiocitos.

Se realizó una tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff), mediante la oxidación con ácido peryódico al 1% durante 15 min y tinción con leucofucsina durante 15min. Esto permitió visualizar el contorno de los cardiomiocitos. Se adquirieron imágenes con ayuda del microscopio de campo claro de *Leica*, a 20x. Posteriormente, se calculó el área individualizada de un total de 70 cardiomiocitos por animal, con ayuda del programa *ImageJ*. El área se expresa en unidades arbitrarias.

3.28.- Análisis estadístico.

La significancia estadística fue estimada mediante la prueba *t* de *Student* utilizando el software GraphPad Pris 4.0. Valores para $p < 0,05$ se consideraron como significativos.

4.- RESULTADOS



4.1.- Regulación de la proliferación celular por Cav1

4.1.1.- La ausencia de Cav1 acelera la proliferación celular.

En primer lugar, se quiso confirmar el fenotipo hiperproliferativo descrito previamente en células deficientes en Cav1^(58, 217). Para ello, se utilizaron cultivos asincrónicos de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs, *murine embryonic fibroblasts*) deficientes en Cav1, con sus correspondientes controles con fenotipo silvestre (wt, *wild type*). Ambos tipos celulares fueron extraídos e immortalizados a partir de dos líneas independientes de ratones (wt y Cav1^{-/-} MEF-R⁽²¹⁷⁾ y wt y Cav1^{-/-} MEF-D⁽⁵⁸⁾). Además, se usaron preadipocitos 3T3L1 con un silenciamiento estable de Cav1 (3T3L1-hcCav1), y sus controles.

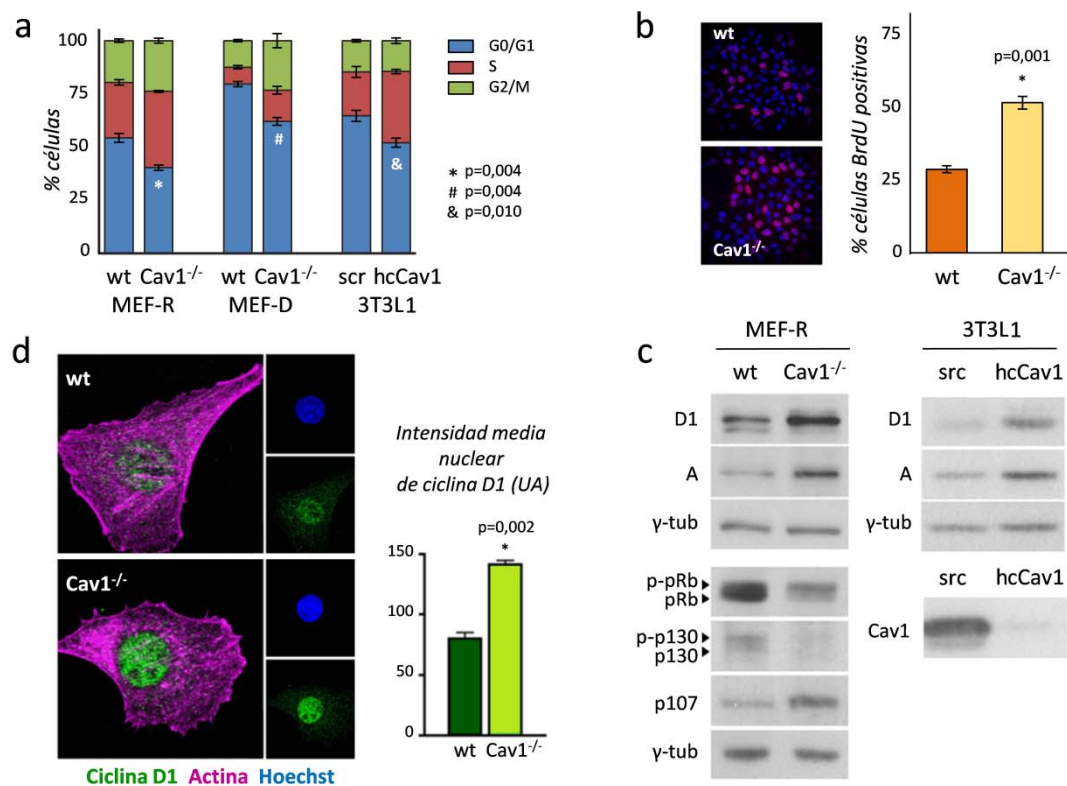


Figura R1: La proliferación celular está aumentada en células deficientes en Cav1. (a) MEFs wt y Cav1^{-/-} procedentes de dos líneas diferentes de ratón (MEF-R y MEF-D) y preadipocitos 3T3L1 silenciados para Cav1 (3T3L1-hcCav1) y su control (3T3L1-scr, *scramble*) fueron cultivados asincrónicamente y posteriormente teñidos con yoduro de propidio para el análisis de las diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo, mostrándose los porcentajes celulares en cada fase de un total de 10.000 células analizadas. (b) Análisis de incorporación de BrdU tras 2h de marcaje en MEF-R wt y Cav1^{-/-}. (c) Análisis por *Western-blot* de cultivos asincrónicos de MEFs-R wt y Cav1^{-/-} (izquierda) y preadipocitos 3T3L1-hcCav1 y 3T3L1-scr (derecha), usándose anticuerpos dirigidos contra ciclina D1, ciclina A, pRb, p130, p107, y γ-tubulina (en el caso de los MEF-R) y anti-ciclina D1, ciclina A, Cav1 y γ-tubulina (como control de carga) en el caso de los preadipocitos 3T3L1. (d) MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron sembrados en adhesión durante 18h y fijados para su posterior tinción mediante inmunofluorescencia indirecta, usando *Hoechst* (marcador de núcleos), anticuerpo anti-ciclina D1 y faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina; se muestra la intensidad media nuclear de la ciclina D1, de 30 células analizadas, medida con el programa *LAS-AF*, en unidades arbitrarias (UA). Las barras en (a), (b) y (d) representan medias ± error estándar de las medias de 3 experimentos independientes.

Mediante análisis de citometría de flujo, que permite distinguir el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular por su contenido en ADN teñido con yoduro de propidio, se pudo comprobar que las células deficientes en Cav1 presentan una menor proporción celular en fase G0/G1 y mayor proporción en fase S (figura R1a). Además, ensayos de incorporación de BrdU (análogo de la timidina) confirmaron el aumento del porcentaje de células en fase S (figura R1b). Estos resultados corroboran que las células deficientes en Cav1 presentan una proliferación más rápida.

Tratando de discernir los mecanismos por los que Cav1 regula el ciclo celular, se analizaron los niveles de expresión de las ciclinas D1 y A, características de las fases G1 y S/G2 respectivamente, y de los tres miembros de la familia de Retinoblastoma: pRb, p130 (Rb2) y p107. Como se muestra en la figura R1c, tanto en los MEF-R Cav1^{-/-} como en las células 3T3L1-hcCav1, los niveles de ambas ciclinas (D1 y A) aparecen elevados, siendo la acumulación de ciclina D1 predominantemente nuclear (figura R1d). El nivel de fosforilación de la proteína pRb es significativamente más alto en MEFs Cav1^{-/-} y, llamativamente, la expresión de pRb total aparece disminuida (figura R1c). Otro miembro de la familia de Retinoblastoma, p130, también presenta niveles más reducidos en los MEF-R Cav1^{-/-} (figura R1c). Se ha descrito que la expresión de p130 se acumula en la fase G1 temprana del ciclo celular; contrariamente, el tercer miembro de la familia, p107, se acumula preferentemente en la fase G1 tardía⁽³⁰⁾, lo que correlaciona con los niveles elevados de esta proteína en células deficientes en Cav1 (figura R1c).

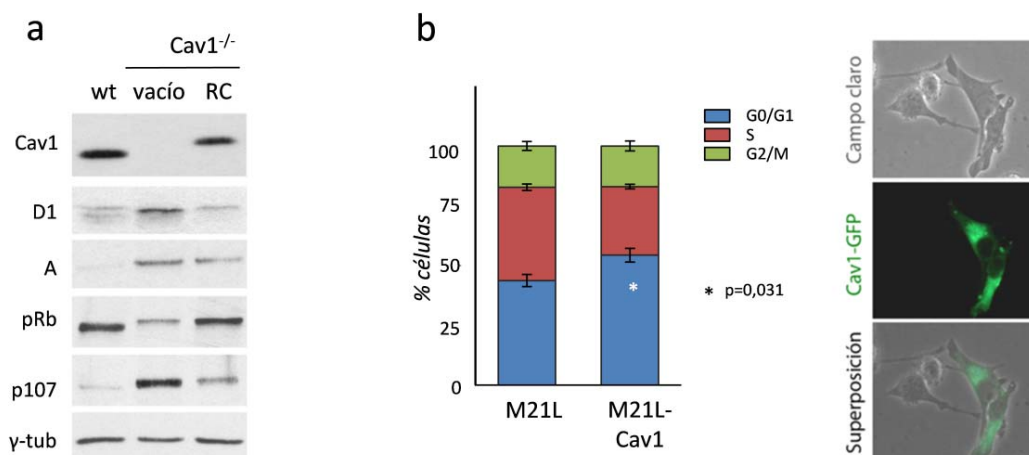


Figura R2: La reconstitución de la expresión de Cav1 revierte el fenotipo hiperproliferativo. (a) Análisis por *Western-blot* de MEF-R wt y Cav1^{-/-} que expresan establemente un vector vacío, o Cav1 (RC) usando anticuerpos anti- Cav1 ciclina D1, ciclina A, pRb, p130, p107 y γ-tubulina, usado éste último como control de carga. (b) Análisis por citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio de células de melanoma humano M21L expresando un vector vacío o una proteína de fusión GFP-Cav1 (M21L-Cav1); se muestran los porcentajes de cada fase del ciclo celular de un total de 10.000 células (izquierda). Expresión de GFP-Cav1 en células M21L adheridas (derecha). Las barras representan medias ± error estándar de las medias de 4 experimentos independientes.

Para concluir que estos fenotipos son efectivamente debidos a la ausencia de Cav1, se utilizaron MEF-R Cav1^{-/-} y células de melanoma humano M21L (que no expresan Cav1), en las cuales se reconstituyó la expresión de Cav1 de forma estable (RC-MEFs y M21L-Cav1 respectivamente). Se comprobó que la restauración de Cav1 rescata el fenotipo del wt tanto en la expresión de los marcadores del ciclo celular (figura R2a) como en la proporción de células en fase G0/G1 (figura R2b).

Por tanto, en conjunto estos resultados permiten concluir que, en ausencia de Cav1, aumenta la proporción de células en las fases tardía, S y G2/M, lo que puede ser un indicativo de una progresión más rápida a través de la fase G1.

4.1.2.- La ausencia de Cav1 coopera en la transformación oncogénica en MEFs.

Estudios previos de otros autores han demostrado que los ratones Cav1^{-/-} presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores ^(28, 307, 309, 311). Además, la deficiencia en Cav1 coopera con determinados oncogenes en la transformación celular, como ya se describió en MEFs con un fondo genético INK4a^{-/-} ⁽³⁰⁸⁾. Dadas estas premisas, se decidió analizar el papel que juega la expresión de Cav1 en el proceso de transformación oncogénica en MEFs. Para ello, se transfectaron MEF-R Cav1^{-/-} inmortal con el oncogen H-RasV12, y se observó que en estas condiciones formaban 10 veces más focos oncogénicos que las células control (figura R3a).

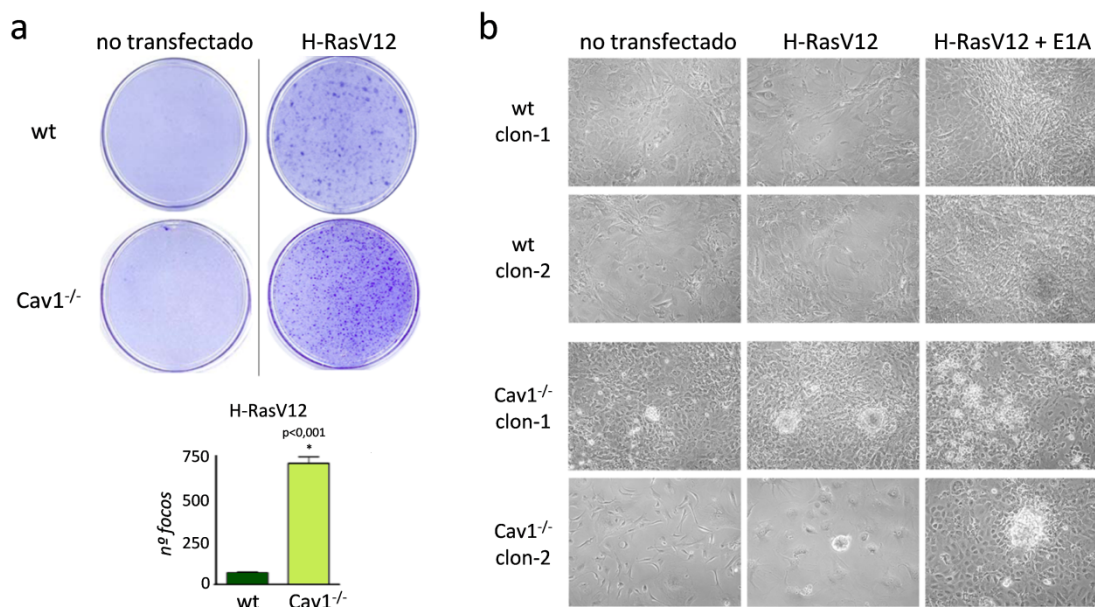


Figura R3: La ausencia de Cav1 coopera en la transformación oncogénica en MEFs. (a) Ensayo de formación de focos de MEF-R wt y Cav1^{-/-} inmortal, tras su transfección con el oncogen H-RasV12. Se representan el número total de focos formados. La proporción de formación de focos en células transfectadas fue de 1/1.000 en las wt y 1/100 células en las Cav1^{-/-}. La barra representa medias \pm error estándar de las medias de 4 experimentos independientes (b) Micrografías en las que se muestran la formación de focos en dos clones primarios independientes de MEFs wt y Cav1^{-/-}, tras su transfección con H-RasV12 o con los oncogenes H-RasV12 y E1A.

Para asegurar que la técnica de immortalización usada no afectaba inespecíficamente a su capacidad de transformación (el protocolo 3T3 para la immortalización fija de forma no controlada diversos cambios genéticos), se transfectaron MEFs primarios extraídos de ratones Cav1^{-/-} y sus controles, con el oncogen H-RasV12, o los oncogenes H-RasV12 y E1A, dado que para la transformación de MEFs primarios se requiere la presencia de al menos dos oncogenes^(142, 231). De manera similar a lo observado en MEFs inmortales, MEFs primarios deficientes en Cav1 mostraron un mayor índice de formación de focos en presencia de los oncogenes H-RasV12 y E1A. Además, en algunas ocasiones se observó incluso la formación de focos en presencia únicamente del oncogen H-RasV12, (figura R3b), confirmándose así que la ausencia de Cav1 promueve la formación de focos oncogénicos, característica de la transformación celular.

4.1.3.- Las células deficientes en Cav1 progresan más rápido a lo largo del ciclo celular.

Dado que las células Cav1^{-/-} presentan una tasa de proliferación más rápida que las células wt, se decidió analizar los efectos de la ausencia de Cav1 en la salida de quiescencia y la progresión a través del ciclo celular. Para ello, se sincronizaron cultivos de MEF-R wt y Cav1^{-/-} mediante privación de suero durante 72h, y posteriormente se estimularon nuevamente con suero para reactivar el ciclo celular.

En primer lugar, se trató de dilucidar si las MEFs Cav1^{-/-} son capaces de entrar en quiescencia (G0) o simplemente se arrestan en la fase G1 temprana. Para ello, se analizaron los niveles de fosforilación de la proteína pRb en las serinas 807 y 811 (Ser807/811) que son residuos diana específicos para el complejo CDK4/6-ciclina D1. Dado que la actividad de dicho complejo es el estímulo inicial para la fosforilación de pRb en la fase G1 temprana⁽²⁵⁸⁾, se asume que cualquier fosforilación residual en células que han sido privadas de suero durante 72h será un indicativo de que estas células están arrestadas en la fase G1 temprana pero no en quiescencia. Como se muestra en la figura R4a, la fosforilación específica de pRb en los residuos Ser807/811 es indetectable tanto en MEF-R wt como Cav1^{-/-} privados de suero, mientras que ambos genotipos muestran una inducción similar tras la adición de suero. Además se analizó la localización subcelular del factor de transcripción FoxO3a, puesto que se ha descrito que se acumula en núcleos de células quiescentes, y se exporta rápidamente tras adición de suero⁽¹⁶⁹⁾. Se observó que tanto los MEF-R wt como los Cav1^{-/-} privados de suero durante 72h presentan una acumulación nuclear de FoxO3a, mientras que su exclusión del núcleo tras 1h de estimulación con suero es similar en ambos genotipos (figura R4b). Estos resultados sugieren que los MEFs Cav1^{-/-} entran en quiescencia con la misma eficacia que los MEFs wt tras privación de suero, y que la cinética de salida de quiescencia también es similar.

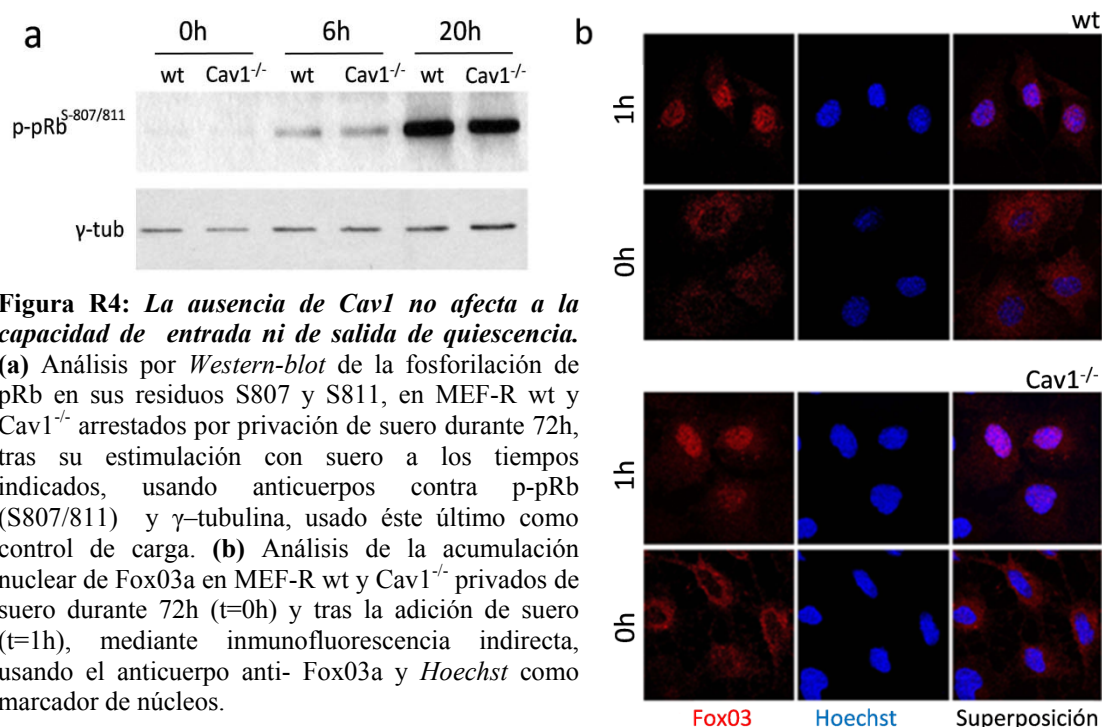


Figura R4: La ausencia de Cav1 no afecta a la capacidad de entrada ni de salida de quiescencia. **(a)** Análisis por *Western-blot* de la fosforilación de pRb en sus residuos S807 y S811, en MEF-R wt y Cav1^{-/-} arrestados por privación de suero durante 72h, tras su estimulación con suero a los tiempos indicados, usando anticuerpos contra p-pRb (S807/811) y γ-tubulina, usado éste último como control de carga. **(b)** Análisis de la acumulación nuclear de FoxO3a en MEF-R wt y Cav1^{-/-} privados de suero durante 72h (t=0h) y tras la adición de suero (t=1h), mediante inmunofluorescencia indirecta, usando el anticuerpo anti-FoxO3a y *Hoechst* como marcador de núcleos.

Posteriormente, se analizó la dinámica del ciclo celular tras la estimulación con suero, mediante técnicas de citometría de flujo y *Western-blot*.

La primera observación fue que cerca del 90% de los MEFs, tanto wt como Cav1^{-/-} se arrestan tras privación de suero (figura R5a), lo que se corresponde con la entrada en la fase G0 según lo anteriormente expuesto.

Posteriormente, como se muestra en la figura R5a las células wt comienzan a salir de la fase G0/G1 a las 16h tras la adición de suero, lo que correlaciona directamente con un aumento de la subpoblación en la fase S. A las 24h, la proporción de células en fase G0/G1 se ha reducido del 86% al 49%, mientras que las fracciones en fases S y G2/M son del 29% y 21% respectivamente. En contraste, los MEF-R Cav1^{-/-} salen de la fase G0/G1 ya a las 12h tras la estimulación con suero (4h antes que los de genotipo wt). Además, progresan más rápido a lo largo del ciclo celular, puesto que a las 16h tras la adición de suero se observa un máximo de casi el 30% de las células en fase S y el 17% ya en la fase G2/M. A las 20h, el porcentaje de células en fase S comienza a disminuir, lo que correlaciona con un máximo de células en fase G2/M del 34%. El aumento de la subpoblación G0/G1 observado a las 24h corresponde con células que están entrando en su segundo ciclo tras la estimulación con suero.

Estas diferencias se ven reflejadas a nivel molecular por la diferente expresión diversos reguladores del ciclo celular, como son las ciclinas, el inhibidor p27^{KIP1} y las proteínas de la familia de Rb (figura R5b). A las 8h de la adición de suero se observa que empieza a

acumularse ciclina D1 en MEF-R wt, alcanzando el máximo a las 16h, justo antes de entrar en fase S (figura R5b). Al tiempo que la proporción de células en fase S aumenta (20h tras adición de suero), los niveles de ciclina D1, así como del inhibidor de CDK2-ciclinaE, p27^{KIP1}, se reducen, mientras que la expresión de ciclina A, asociada a la fase G2, va aumentando. La fosforilación de Rb y p130 se comienza a detectar a las 12h y 4h respectivamente tras la adición de suero en los MEF-R wt. También se observa un aumento progresivo de los niveles de p107 tras la estimulación, lo que correlaciona con la salida de la fase G0 y la progresión a través de las fases G1 y S.

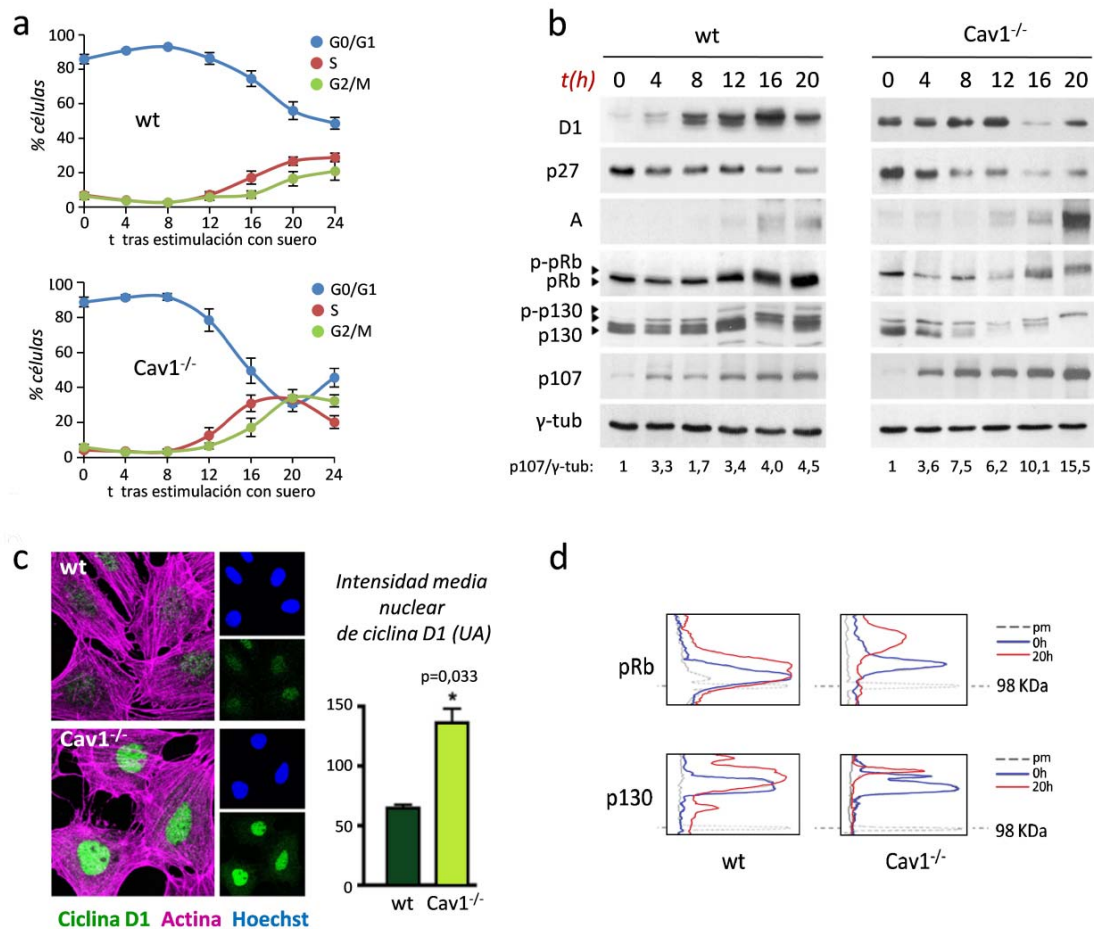


Figura R5: Las células deficientes en Cav1 progresan más rápido a través de la fase G1 y entran antes en la fase S. MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron sincronizados en la fase G0 por privación de suero durante 72h, y posteriormente estimulados con suero. **(a)** Tras los tiempos indicados, fueron teñidos con yoduro de propidio para su análisis por citometría de flujo. Se expresan los porcentajes en fase G0/G1, S y G2/M de 10.000 células analizadas. **(b)** Análisis por Western-blot con anticuerpos anti- ciclina D1, p27^{KIP1}, ciclina A, pRb, p107, p130 y γ -tubulina, (como control de carga). Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de p107 normalizada respecto a la γ -tubulina (unidades arbitrarias). **(c)** MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron sincronizados por privación de suero en la fase G0 y posteriormente fijados y teñidos por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo anti- ciclina D1, faloidina, para ver la morfología del citoesqueleto de actina y Hoechst para visualizar los núcleos. Se indica la intensidad media nuclear de ciclina D1, de 30 células analizadas, medida con el programa LAS-AF, en unidades arbitrarias (UA). **(d)** Esquema representativo de la movilidad electroforética de pRb y p130 comparada con un marcador de peso molecular estándar (pm) en MEF-R wt y Cav1^{-/-} a los tiempos indicados de estimulación con suero. Las barras en (a) y (c) representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes.

En los MEF-R Cav1^{-/-}, en cambio, se observa que los niveles de ciclina D1 son altos en quiescencia inducida por privación de suero (figura R5b), donde su acumulación es predominantemente nuclear (fig R5c). Estos niveles de ciclina D1 tienden a incrementarse ligeramente hasta las 8h tras adición de suero y no disminuyen hasta las 16h, presumiblemente debido a degradación proteosómica, que tiene lugar durante la fase S^(55, 56) (figura R5b). Esto correlaciona con el incremento de células en fase S y el mínimo en los niveles de la proteína p27^{KIP1}. El aumento de los niveles de ciclina A en los MEF-R Cav1^{-/-} es también más pronunciado, y los niveles máximos de ciclina A y fosforilación de pRb se alcanzan a las 20h tras la adición de suero, coincidiendo con el mínimo en la proporción de células en fase G1 y los máximos en S y G2/M (figura R5a). Aunque no se observan grandes cambios en la cinética de fosforilación de Rb y p130 (a pesar de que éste es el principal mecanismo de regulación de estas proteínas), sus niveles de expresión están reducidos en MEF-R Cav1^{-/-} respecto a los MEF-R wt, probablemente contribuyendo a una progresión más rápida a través de la fase G1 (figura R5a, d). Sin embargo, el incremento en los niveles de p107 tras la estimulación con suero es más pronunciado en MEFs deficientes en Cav1 (un incremento de 15 veces a 20h) que en los wt (un incremento de sólo 4 veces).

En conjunto, todos estos resultados muestran que la ausencia de Cav1 no afecta a la capacidad de entrada ni salida de quiescencia, pero promueve una progresión más rápida través de la fase G1 del ciclo celular.

4.1.4.- La acumulación de ciclina D1 en células deficientes en Cav1 es independiente de la fosforilación de Erk y dependiente de activación de Rac.

La inducción de ciclina D1 en respuesta a la adición de suero requiere una activación sostenida de Erk, y esto está modulado por la actividad de Rho-GTPasas⁽³⁰³⁾. Como la ausencia de Cav1 ha sido relacionada con una hiperactivación de la vía p42/44 MAP-quinasa (Erk1/2) tanto *in vitro* como en modelos de ratones deficientes en Cav1^(77, 144), se consideró la posibilidad de que esta vía estuviera mediando la acumulación de ciclina D1 en fase G0 observada en células Cav1^{-/-} (figuras R5b y c). Por ello, se decidió analizar los efectos de la inhibición de la fosforilación de Erk en células Cav1^{-/-} sincronizadas en la fase G0, mediante el uso del inhibidor específico U0126 previo a la estimulación con suero. Sorprendentemente, la inhibición específica de la fosforilación de Erk con U0126 no interfiere con la expresión de ciclina D1 ni en la fase G0, ni a lo largo de la fase G1 (figura R6a), indicando que la acumulación de ciclina D1 en células deficientes en Cav1 es independiente de la activación de la vía Ras/MEK/MAP-quinasa.

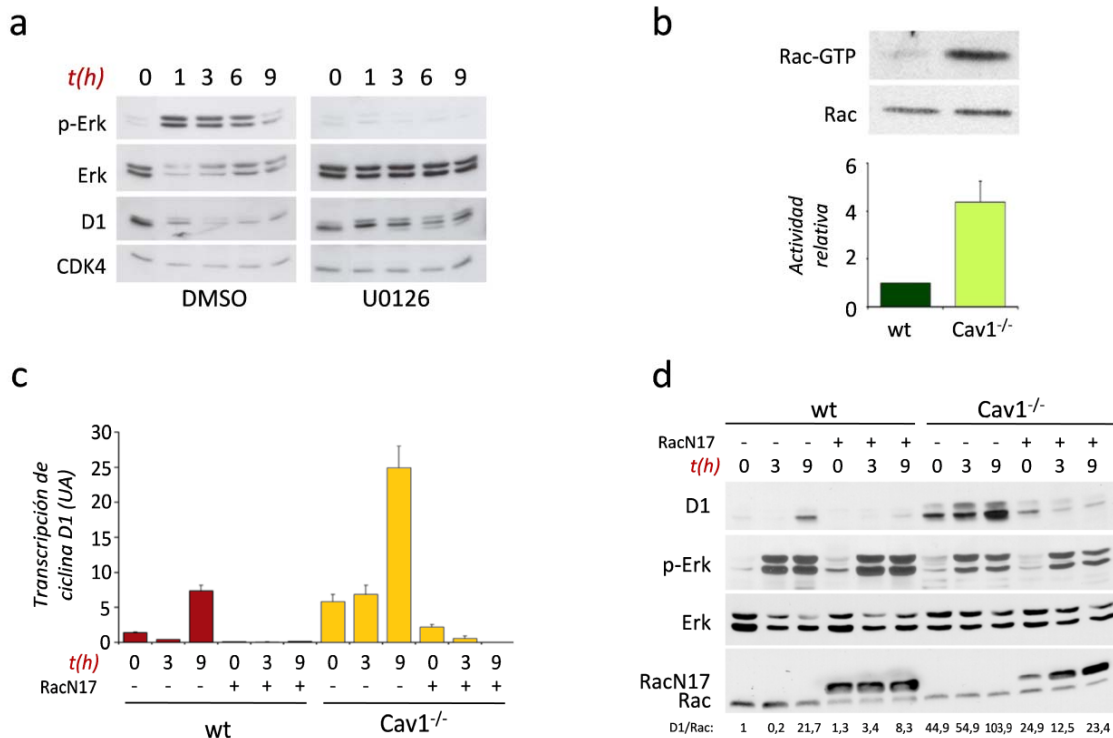


Figura R6. La acumulación de ciclina D1 en células deficientes en Cav1 es independiente de la fosforilación de Erk y dependiente de la activación de Rac. (a) Análisis por *Western-blot* de MEF-R Cav1^{-/-} sincronizados por privación de suero en la fase G0 durante 72h en presencia o ausencia del inhibidor de la vía p42/44 MAPK (U0126, 10μM). Posteriormente fueron recogidos a los tiempos indicados tras estimulación con suero, para su análisis por *Western-blot* con anticuerpos dirigidos contra fosfo-Erk, Erk total, ciclina D1 y CDK4, como control de carga. (b) Análisis de la actividad de Rac mediante ensayos de *pull-down* de Rac-GTP con GST-PBD en MEF-R wt y Cav1^{-/-} en fase G0 (por privación de suero durante 72h). La cantidad de Rac-GTP y Rac total se analiza por *Western-blot* con anticuerpo anti- Rac y se muestra el análisis densitométrico de Rac-GTP normalizado respecto a Rac total (unidades arbitrarias). (c) MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron infectados con adenovirus conteniendo LacZ (control) o la forma dominante negativa RacN17. Tras su sincronización en G0, las células fueron estimuladas con suero y recogidas a los tiempos indicados para su análisis por RT-PCR cuantitativa del ARNm de ciclina D1. (d) Análisis por *Western-blot* de células tratadas como en (c), usando anticuerpos contra ciclina D1, Rac, fosfo-Erk y Erk total, como control de carga junto al Rac endógeno. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de ciclina D1 normalizada respecto a Rac endógeno (unidades arbitrarias). Las barras en (b) y (c) representan media ± error estándar de las medias de 4 y 3 experimentos independientes, respectivamente.

Otra ruta que regula la expresión de ciclina D1 es la mediada por la GTPasa Rac^(128, 174). Puesto que ya se describió que la activación de Rac en MEF-R Cav1^{-/-} está aumentada⁽⁹⁵⁾, se decidió analizar la posible implicación de esta vía en la acumulación de ciclina D1 en G0, observada en MEF-R Cav1^{-/-}. En primer lugar, mediante ensayos de *pull-down* con GST-PBD, se analizó la actividad de Rac en MEF-R wt y Cav1^{-/-} quiescentes (arrestados por privación de suero) y se observó que los niveles de Rac-GTP están aumentados más de 4 veces en los MEFs deficientes en Cav1 respecto a los wt (figura R6b), siendo esta diferencia incluso mayor que en

MEFs sincrónicos ⁽⁹⁵⁾, lo que correlaciona con los altos niveles de ciclina D1 en fase G0 observado en estas células.

A continuación, se analizó el efecto de la inhibición de Rac sobre la acumulación de ciclina D1 mediante la infección adenoviral del dominante negativo de Rac (RacN17) en MEF-R wt y Cav1^{-/-}. Tras su sincronización en G0 en estas condiciones, se observó que los niveles de ciclina D1 en respuesta a la adición de suero están severamente disminuidos en MEFs de ambos genotipos (figura R6d), así como que la expresión de ciclina D1 en células Cav1^{-/-} infectadas con el adenovirus con RacN17 está también reducida en la fase G0, lo que indica que la activación de Rac es necesaria para la acumulación de ciclina D1 en estas células en quiescencia. Además, los niveles del ARNm de ciclina D1 están disminuidos tanto en MEFs wt como Cav1^{-/-} transfectados con RacN17 en respuesta a la estimulación con suero (figura R6c), lo que permite concluir que la activación de Rac regula los niveles de ciclina D1 a nivel transcripcional, en células deficientes en Cav1.

Finalmente, se analizaron los efectos de la sobreexpresión de RacN17 sobre la activación de Erk, en MEFs sincronizados de ambos genotipos. Se observó que la inhibición de Rac no afecta a la fosforilación de Erk en respuesta a la estimulación con suero en cultivos sincrónicos de MEF-R wt ni Cav1^{-/-} (figura R6d).

Por tanto, la activación de Rac media la acumulación de ciclina D1 en MEFs Cav1^{-/-} por un mecanismo independiente de la fosforilación de Erk.

4.2.- Regulación del crecimiento dependiente de adhesión por Cav1.

4.2.1.- Las células deficientes en Cav1 son capaces de p independientemente de adhesión y presentan mayor resistencia al proceso de *anoikis*.

Varios estudios previos sugieren una relación entre la pérdida de la expresión de Cav1 y la capacidad celular de eludir el control de la proliferación ejercido por adhesión a MEC ^(62, 77, 277). Por tanto, se comprobó si fibroblastos derivados de ratones Cav1^{-/-} presentaban también esta característica. Para ello, se sembraron en agar blando tanto MEF-R como fibroblastos de timo (TFs, *thymus fibroblasts*) wt y Cav1^{-/-}. Al cabo de 2 semanas se observó que ambos tipos de células Cav1^{-/-} eran capaces de formar colonias en agar blando (figura R7a y b panel izquierdo). Además, la re-introducción de Cav1 en estas células revierte el fenotipo, disminuyendo la formación de colonias cerca del 80% (figura R7a y b panel derecho). Esto indica que la ausencia de Cav1 permite a las células crecer independientemente de adhesión, sugiriendo que éste puede ser un paso importante en la adquisición de la transformación celular antes observada.

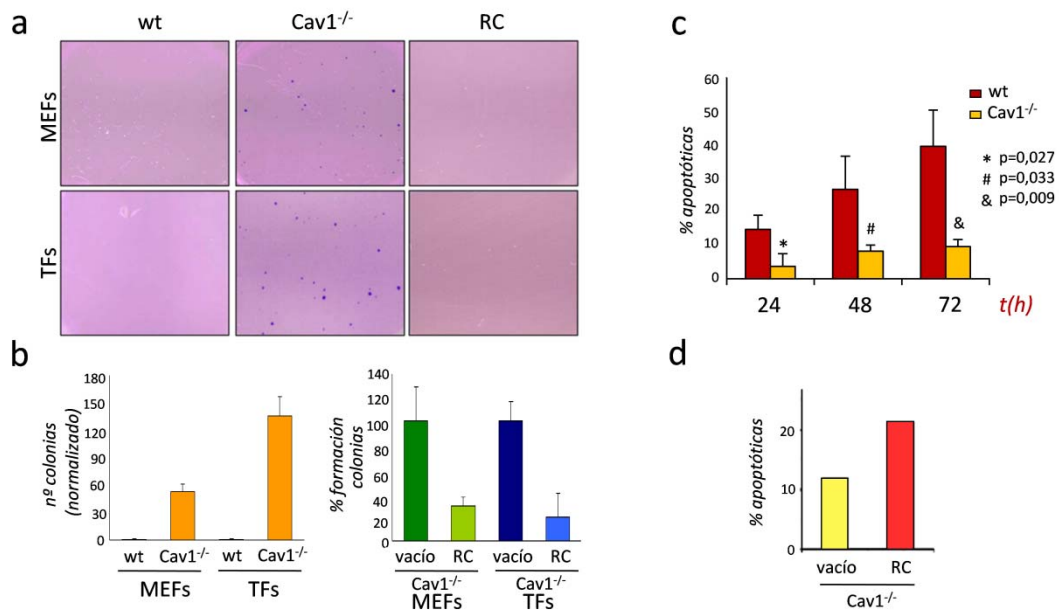


Figura R7. Fibroblastos deficientes en Cav1 son capaces de crecer en agar blando y de sobrevivir en condiciones de pérdida de adhesión a sustrato. (a) MEF-R y TFs wt, Cav1^{-/-} y Cav1^{-/-} reconstituídos establemente con Cav1(RC) son sembrados en agar blando durante 2 semanas, teñidos con cristal violeta y fotografiados. (b) Número de colonias formadas en agar blando por MEFs y TFs wt y Cav1^{-/-} (panel de la izquierda). Porcentaje de formación de colonias en MEFs y TFs reconstituídos con Cav1 (panel de la derecha). (c) MEF-R wt y Cav1^{-/-} son cultivados en suspensión en un medio con metilcelulosa y en rotación continua. Posteriormente fueron recogidos a los tiempos indicados, y analizados por citometría de flujo tras su tinción con yoduro de propidio, mostrándose el porcentaje de células en fase subG0 (apoptóticas) de un total de 10.000 células analizadas. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes. (d) MEF-R Cav1^{-/-} que expresan establemente un vector vacío, o Cav1 (RC) fueron analizados como en (c), mostrándose los porcentajes de células en fase subG0 (apoptóticas).

Por otra parte, se ha descrito que las células que han perdido su interacción con MEC sufren un proceso de muerte celular programada, conocido con el nombre de *anoikis* ⁽⁷²⁾. Por este motivo, se quiso comprobar si las células deficientes en Cav1 son más resistentes a este proceso de apoptosis en suspensión que las células wt. Para ello, se cultivaron MEF-R wt y Cav1^{-/-} en un medio que contenía metilcelulosa, en constante rotación durante 24, 48 y 72h. Posteriormente, las células fueron analizadas por citometría de flujo, tiñendo su contenido de ADN con yoduro de propidio y cuantificando la proporción de células en fase subG0 (indicativo de células apoptóticas). Como se observa en la figura R7c, las células wt sufren un proceso de apoptosis por pérdida de adhesión a sustrato, que va incrementándose a lo largo del tiempo, mientras que las células Cav1^{-/-} son más resistentes al proceso *anoikis*, manteniéndose el porcentaje de células apoptóticas alrededor del 10% incluso a las 72h. La re-expresión de Cav1 en MEF-R Cav1^{-/-} (RC) es capaz de revertir el fenotipo a las 48h (figura R7d), indicando que la ausencia de Cav1 confiere a la células la capacidad de resistencia a *anoikis*, lo que correlaciona con su capacidad de crecimiento independiente de adhesión.

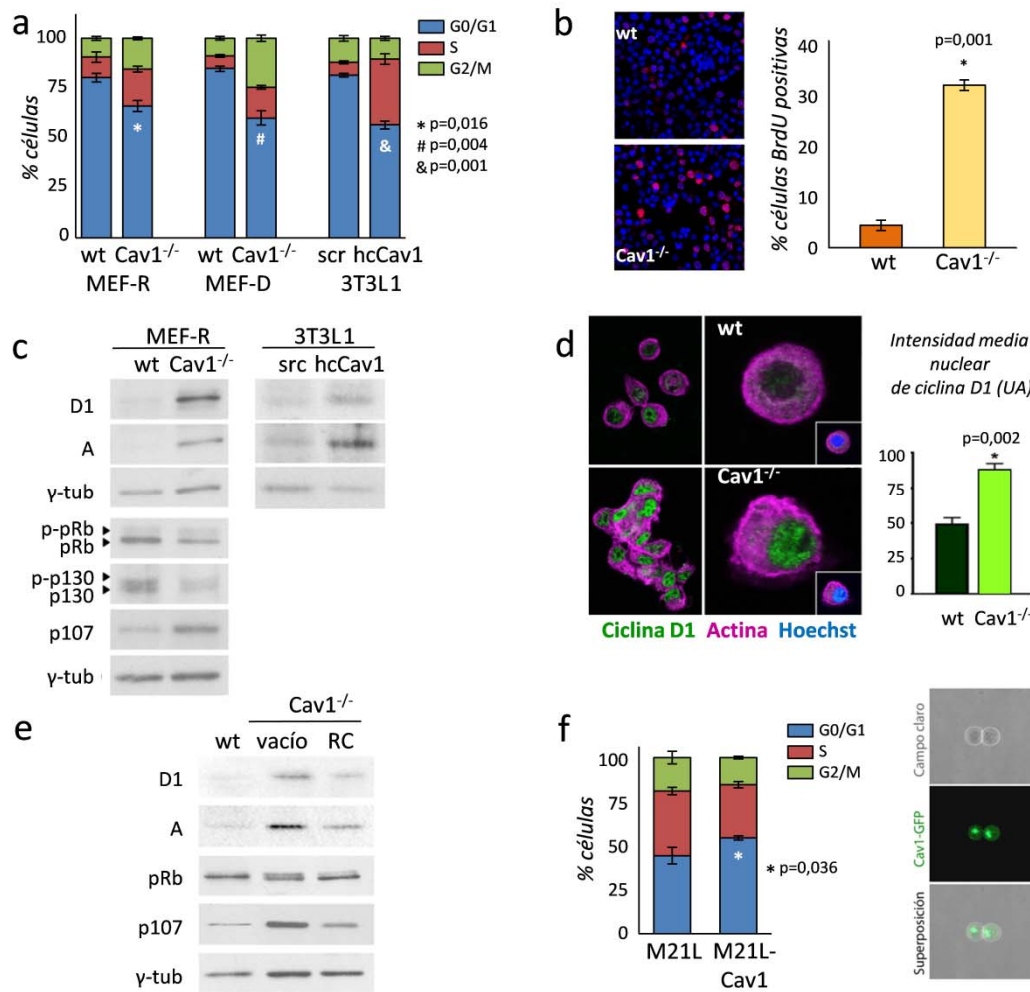


Figura R8. Análisis de la capacidad de crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1. (a) MEF-R y MEF-D wt y Cav1^{-/-}, y preadipocitos 3T3L1 silenciados para Cav1 (3T3L1-hcCav1) y su control (3T3L1- src, “scramble”) fueron cultivados en suspensión en placas recubiertas de agar durante 18h y posteriormente teñidos con yoduro de propidio para el análisis de las diferentes fases del ciclo celular por citometría de flujo, mostrándose los porcentajes celulares en cada fase de un total de 10.000 células analizadas. (b) Análisis de incorporación de BrdU tras 2h de marcaje en MEF-R wt y Cav1^{-/-} cultivados durante 18h en medio con metilcelulosa, en constante rotación. (c) Análisis por Western-blot de MEFs-R wt y Cav1^{-/-} (izquierda) y preadipocitos 3T3L1-hcCav1 y 3T3L1-src (derecha) cultivados en placas de agar durante 18h, usándose anticuerpos dirigidos contra ciclina D1, ciclina A, pRb, p130, p107, y γ-tubulina (en el caso de los MEF-R) y anti- ciclina D1, ciclina A y γ-tubulina (como control de carga) en el caso de los preadipocitos 3T3L1. (d) MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron sembrados en suspensión en placas de agar durante 18h, y teñidos por inmunofluorescencia indirecta, usando anticuerpo anti-ciclina D1, faloidina (para visualizar el citoesqueleto de actina) y Hoechst (para marcar los núcleos); se muestra la intensidad media nuclear de la ciclina D1, de 30 células analizadas, medida con el programa LAS-AF, en unidades arbitrarias (UA). (e) Análisis por Western-blot de MEF-R wt y Cav1^{-/-} que expresan establemente un vector vacío, o Cav1 (RC), cultivados en suspensión en placas de agar durante 18h; se usaron anticuerpos anti- Cav1, ciclina D1, ciclina A, pRb, p130, p107 y γ-tubulina (como control de carga). (f) Análisis por citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio de células de melanoma humano M21L expresando un vector vacío o una proteína de fusión GFP-Cav1 (M21L-Cav1) cultivadas en suspensión en placas de agar durante 18h; se muestran los porcentajes de cada fase del ciclo celular de un total de 10.000 células (izquierda). Expresión de GFP-Cav1 en células M21L en suspensión (derecha). Las barras en (a), (b), (d) y (e) representan medias ± error estándar de las medias de 5, 3, 3 y 3 experimentos independientes, respectivamente.

Para analizar de manera más detallada la progresión del ciclo celular en condiciones de no adhesión a sustrato, se utilizaron de nuevo las dos líneas Cav1^{-/-} de MEFs (MEF-R y MEF-D) con sus correspondientes controles, así como preadipocitos 3T3L1 con un silenciamiento estable de Cav1 (3T3L1-hcCav1), y sus controles. Estas células fueron cultivadas en suspensión durante 18h sobre placas recubiertas con una fina capa de agar, lo que impide la adhesión celular. En estas condiciones, se observó que las células wt salen del ciclo celular y son arrestadas en la fase G0/G1 en una proporción de alrededor del 80%, siendo este arresto similar al observado por privación de suero en células wt en adhesión (figura R8a). En cambio, las células deficientes en Cav1 presentan una proporción menor de células arrestadas en suspensión (sobre el 60%), acompañado por un aumento en el número de células en fases S y G2/M (figura R8a).

En una aproximación alternativa, se analizó la proporción de células en fase S en MEF-R wt y Cav1^{-/-} en suspensión, esta vez cultivando las células en un medio con metilcelulosa y en rotación continua durante 18h. Se observó, mediante ensayos de incorporación de BrdU, que los MEF-R Cav1^{-/-} presentan una proporción de células en fase S aproximadamente 8 veces mayor que las wt (figura R8b).

El análisis bioquímico mediante *Western-blot* de diferentes reguladores del ciclo celular, en MEF-R y células 3T3L1, revela que el arresto observado en células wt en suspensión se ve acompañado de una disminución de los niveles de expresión de las ciclinas D1 y A, lo que correlaciona con una acumulación de pRb hipofosforilado (figura R8c). En contraste, los niveles de ambas ciclinas están elevados en las células Cav1^{-/-} (figura R8c), siendo la acumulación de ciclina D1 mayoritariamente nuclear (figura R8d). Esto va acompañado de una disminución de los niveles de totales las proteínas pRb y p130, así como de un aumento en la expresión de p107 (figura R8c). La re-expresión de Cav1 en MEF-R Cav1^{-/-} y células M21L (RC-MEFs y M21L-Cav1 respectivamente) lleva a la recuperación del fenotipo wt tanto en la expresión de los marcadores del ciclo celular (figura R8e) como en la proporción de células en fase G0/G1 (figura R8f) en suspensión.

En conjunto, todos estos datos indican que las células deficientes en Cav1 no sólo son más resistentes al proceso de apoptosis por pérdida de adhesión a la matriz extracelular, sino que también son capaces de proliferar en estas condiciones.

4.2.2.- El crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1 es Erk independiente pero requiere la activación de Rac y la vía PI3K-Akt-GSK3β.

Posteriormente, se trató de dilucidar qué rutas de señalización eran las responsables de este crecimiento independiente de adhesión observado en células deficientes en Cav1. Se consideraron como candidatas las vías de Ras-p42/44MAPK, Rac-Pak y PI3K-Akt, puesto que ya había sido descrito anteriormente que están activadas en células Cav1^{-/-} en suspensión ⁽⁴⁹⁾.

Comenzando con la vía de p42/44MAPK, se cultivaron MEF-R wt y Cav1^{-/-} durante 18h en suspensión, en presencia o ausencia del inhibidor U0126. Se observó que la mayor proliferación celular así como el aumento en la expresión de ciclinas D1 y A en células Cav1^{-/-} en suspensión, no se ven afectados por la inhibición específica de la fosforilación de Erk (figura R9a y b), indicando que la vía de p42/44MAPK no está implicada en el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión observado en MEFs Cav1^{-/-}.

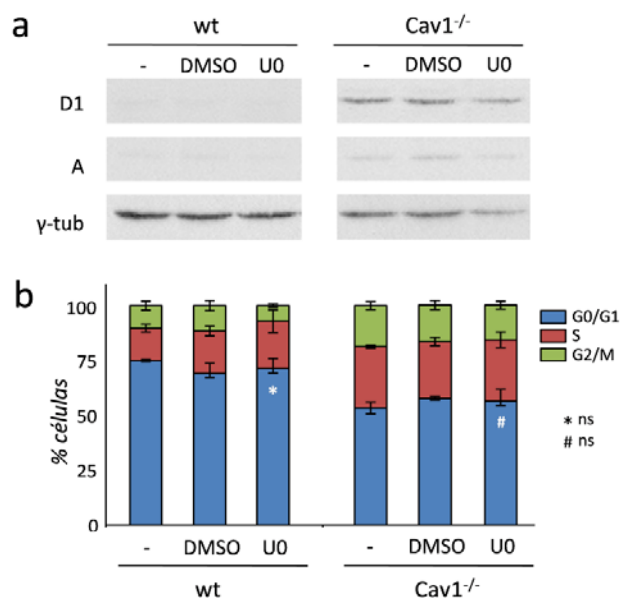


Figura R9. El crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1 es independiente de la activación de Erk. MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron cultivados en suspensión en placas de agar durante 18h en presencia o ausencia del inhibidor de la fosforilación de Erk (U0126, 10 μM). DMSO: dimetilsulfóxido, disolvente del inhibidor. **(a)** Análisis por *Western-blot* usando anticuerpos contra ciclina D1, ciclina A y γ-tubulina (control de carga). **(b)** Análisis por citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. Se muestran los porcentajes de cada fase del ciclo de un total de 10.000 células. Las barras representan medias ± error estándar de las medias de 3 experimentos independientes.

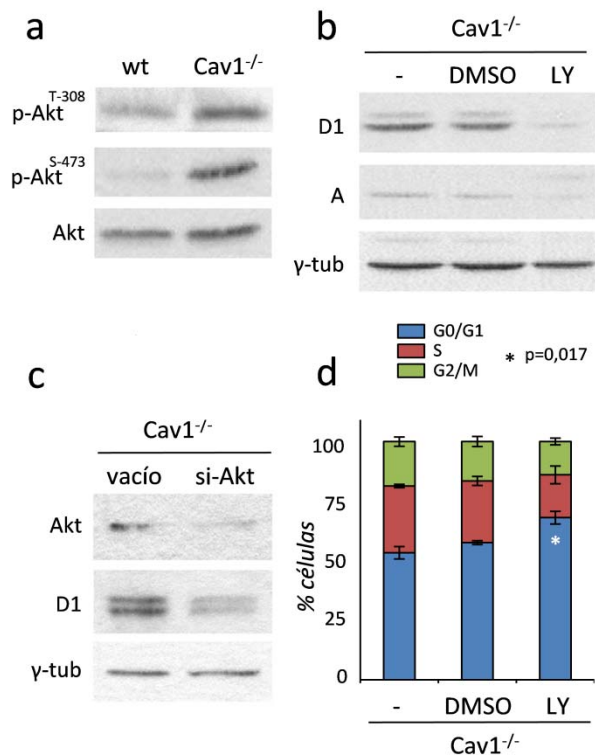
En cuanto a la posible implicación de la vía de PI3K-Akt, se describió previamente que está hiperactivada en ausencia de Cav1^(49, 93, 182), lo que se corroboró en MEF-R Cav1^{-/-} en suspensión (figura R10a) mediante el análisis de la fosforilación de Akt en la treonina 308 (T-308) y la serina 473 (S-473). La inhibición específica de PI3K mediante el inhibidor farmacológico LY294002 reduce la expresión de las ciclinas D1 y A en MEF-R Cav1^{-/-} en suspensión (figura R10b), correlacionando con un aumento en la proporción de células en fase G0/G1 (del 53 al 68%) y la disminución del porcentaje en fases S y G2/M (figura R10d). Los mismos efectos sobre la expresión de ciclina D1 se observan con el silenciamiento de Akt en MEF-R Cav1^{-/-} mediante su transfección con un vector codificante de un ARNi específico para Akt (figura R10c).

Dado que la vía PI3K-Akt regula los niveles de ciclina D1 a través de la inhibición de GSK3β, actuando este último como un regulador negativo de la expresión y acumulación nuclear de ciclina D1⁽⁵⁵⁾, se procedió a comprobar si GSK3β estaba implicado en el fenotipo hiperproliferativo en suspensión de las células deficientes en Cav1. Para ello, se cultivaron MEF-R wt en suspensión, en presencia o ausencia del inhibidor de GSK3β, LiCl, y se observó que esta inhibición es capaz de aumentar la expresión de ciclinas D1 y A en células wt (figura

R11a), mimetizando el fenotipo Cav1^{-/-}, lo que correlaciona con una reducción pronunciada del porcentaje de células en fase G0/G1 (del 75% al 39%) y un incremento en la proporción de células en fases S y G2/M (figura R11b). Tras la inhibición específica de GSK3β mediante un ARNhc específico, se observa también el aumento de la expresión de ciclina D1 en células wt (figura R11c).

Figura R10. La activación de la vía PI3K-Akt está implicada en el crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1. (a) MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron cultivados en suspensión en placas de agar durante 18h. Se muestra el análisis por *Western-blot* usando anticuerpos dirigidos contra dos sitios de fosforilación de Akt, requeridos para su completa activación (p-Akt pT308 y pS473), y Akt total, como control de carga. (b) MEF-R Cav1^{-/-} fueron cultivados en suspensión en placas de agar durante 18h en presencia o ausencia del inhibidor de la fosforilación de Akt (LY294002, 50 μM). DMSO: dimetilsulfóxido, disolvente del inhibidor. Se muestra el análisis por *Western-blot* usando anticuerpos anti- ciclina D1, ciclina A y γ-tubulina (control de carga). (c) MEF-R Cav1^{-/-} fueron silenciados transitoriamente mediante un ARNi específico para Akt. A los

2 días se pusieron en suspensión durante 18h, y se analizaron por *Western-blot* usando anticuerpos contra Akt, ciclina D1 y γ-tubulina (control de carga). (d) Análisis por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo de MEF-R Cav1^{-/-} tratados como en (b). Se muestran los porcentajes de cada fase del ciclo celular de un total de 10.000 células. Las barras representan medias ± error estándar de las medias de 3 experimentos independientes.



Para confirmar la especificidad de esta vía, se analizó la posible activación de mTORC/S6K, clásicamente activada por PI3K-Akt. En MEF-R wt y Cav1^{-/-} cultivados en suspensión durante 18h, se analizó la fosforilación de S6K, como indicador de la activación de mTORC, y se observó que en células Cav1^{-/-} en suspensión la ruta mTORC/S6K no está activada, e incluso S6K aparece hipofosforilado (figura R11d). Esto sugiere que los efectos de la vía PI3K-Akt sobre la hiperproliferación celular en MEFs Cav1^{-/-} en suspensión no están mediados a través de la vía mTORC/S6K, reforzando la hipótesis de la especificidad de la ruta PI3K-Akt-GSK3β.

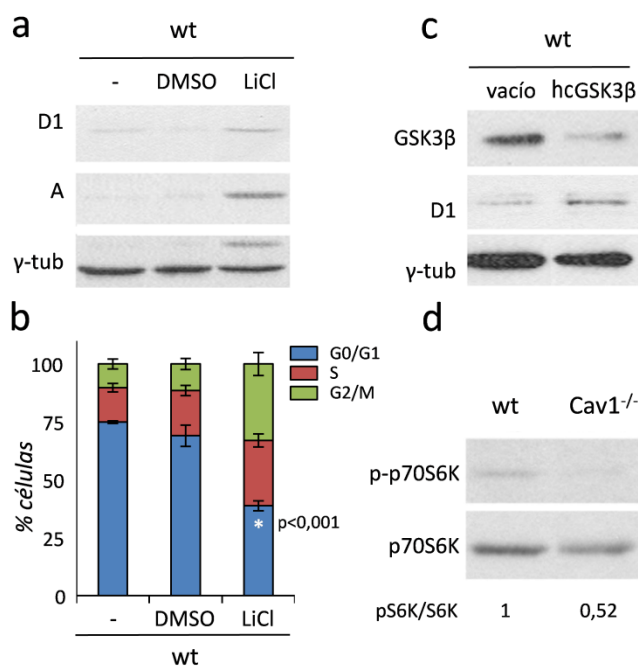


Figura R11. El efecto de PI3K-Akt sobre el crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1 está mediado específicamente a través de GSK3β. (a) MEF-R wt fueron cultivados en suspensión en placas de agar durante 18h en presencia o ausencia del inhibidor de GSK3β (LiCl, 40mM). DMSO: dimetilsulfóxido, disolvente del inhibidor. Se muestra el análisis por Western-blot usando anticuerpos anti- ciclina D1, ciclina A y γ -tubulina (control de carga). (b) Análisis por citometría de flujo de las fases del ciclo celular de MEF-R wt tratados como en (a). Se muestran los porcentajes en cada fase de un total de 10.000 células. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes. (c) MEF-R wt fueron silenciados transitoriamente mediante transfección de un vector codificante para un ARNhc específico para GSK3β. A las 24h se cultivaron en

suspensión durante 18h, y se analizaron por Western-blot con anticuerpos contra GSK3β, ciclina D1 y γ -tubulina (control de carga). (d) MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron cultivados en suspensión durante 18h en placas de agar. Se muestra el análisis por Western-blot usando anticuerpos dirigidos contra fosfo-S6K, y S6K total, como control de carga. Se indica el análisis densitométrico de fosfo-S6K normalizada respecto a S6K total (unidades arbitrarias).

Por último, se ha descrito que la vía de Rac-PAK parece estar activada en células Cav1^{-/-} en suspensión, debido a un defecto en la internalización de microdominios de membrana enriquecidos en colesterol (CEMMs, *cholesterol enriched membrane microdomains*) tras la pérdida de adhesión a la matriz extracelular⁽⁴⁹⁾. Además, como se ha visto, la actividad de Rac es crítica para la expresión de ciclina D1 en células Cav1^{-/-} en adhesión (figura R6c, d). Por tanto, se postuló que esta vía podía estar implicada en el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión. Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar, se estudiaron los efectos de la activación constitutiva de Rac en células wt; para ello, se utilizaron fibroblastos de rata Rat1 transfectados con un vector vacío (Rat1 V8) o con un vector que contenía la forma constitutivamente activa de Rac, RacV12 (Rat1 RacV12) que responde a un promotor represible por tetraciclina (sistema *tet-off*). Estas células se pre-cultivaron en presencia o ausencia de doxíciclina, que es un análogo de tetraciclina, durante 2 días en adhesión para inducir la expresión de RacV12, y después fueron cultivadas en suspensión en placas recubiertas de agar durante 18h. Como se observa en la figura R12a, los fibroblastos Rat1 que expresan RacV12 presentan niveles más elevados de ciclina D1, correlacionando con una disminución en la proporción de células en la fase G0/G1 (figura R12b).

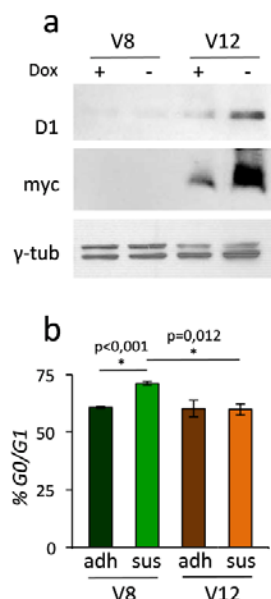


Figura R12. La expresión constitutiva de Rac lleva a la expresión de ciclina D1 y a la proliferación independiente de adhesión. Fibroblastos de rata Rat1 transfectados establemente con un vector vacío (Rat1 V8) y con un plásmido que contenía la forma constitutivamente activa de Rac fusionada a un epítipo myc (Rat1 RacV12) son cultivados en presencia o ausencia de doxiciclina. A los 2 días se ponen en suspensión en placas de agar durante 18h. **(a)** Análisis por *Western-blot* con anticuerpos dirigidos contra ciclina D1, γ -tubulina (como control de carga) y myc (como control de expresión de RacV12). **(b)** Análisis de la fase G0/G1 del ciclo celular por citometría de flujo, tras tinción con yoduro de propidio. Se indican los porcentajes celulares en cada fase de un total de 10.000 células analizadas. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes.

En el sentido opuesto, la elevada expresión de ciclinas D1 y A que se observa en MEF-R Cav1^{-/-} en suspensión se ve reducida tras la inhibición de Rac mediante la expresión transitoria del mutante dominante negativo RacN17 (figura R13a), o el silenciamiento de Rac mediante un RNA de interferencia (figura R13c). La inhibición de Rac también es capaz de recuperar las proporciones celulares en fase G0/G1 en células Cav1^{-/-} en suspensión (figura R13b). La reducción en el porcentaje celular en fase G0/G1 que se observa tanto en células wt como Cav1^{-/-} en suspensión que contienen el vector vacío es un efecto secundario de la electroporación, observado consistentemente en todos los experimentos.

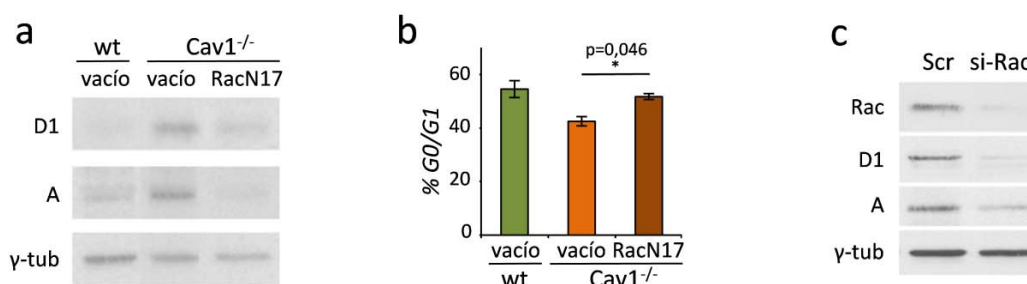


Figura R13. La inhibición de Rac arresta el ciclo celular en células deficientes en Cav1 que han perdido la adhesión a sustrato. MEF-R Cav1^{-/-} fueron transfectados transitoriamente mediante electroporación con un vector vacío y un plásmido que contenía la forma dominante negativa RacN17. Tras 24h se pusieron durante 18h en suspensión en placas de agar. **(a)** Análisis por *Western-blot* con anticuerpos anti- ciclina D1, ciclina A y γ -tubulina, como control de carga. **(b)** Análisis por citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio de las fases del ciclo celular en MEF-R Cav1^{-/-} tratados como en (a). Se indican los porcentajes celulares en cada fase de un total de 10.000 células analizadas. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes. **(c)** MEF-R Cav1^{-/-} fueron silenciados transitoriamente para Rac mediante un ARN de interferencia específico, y su control (scr, "scramble"). A las 24h se pusieron las células en suspensión en placas de agar durante 18h y se analizaron por *Western-blot*, utilizando anticuerpos anti-Rac, ciclina D1, ciclina A y a γ -tubulina, como control de carga.

Por tanto, la activación de Rac en células no adherentes es necesaria y suficiente para la acumulación de ciclina D1 y la proliferación independiente de adhesión.

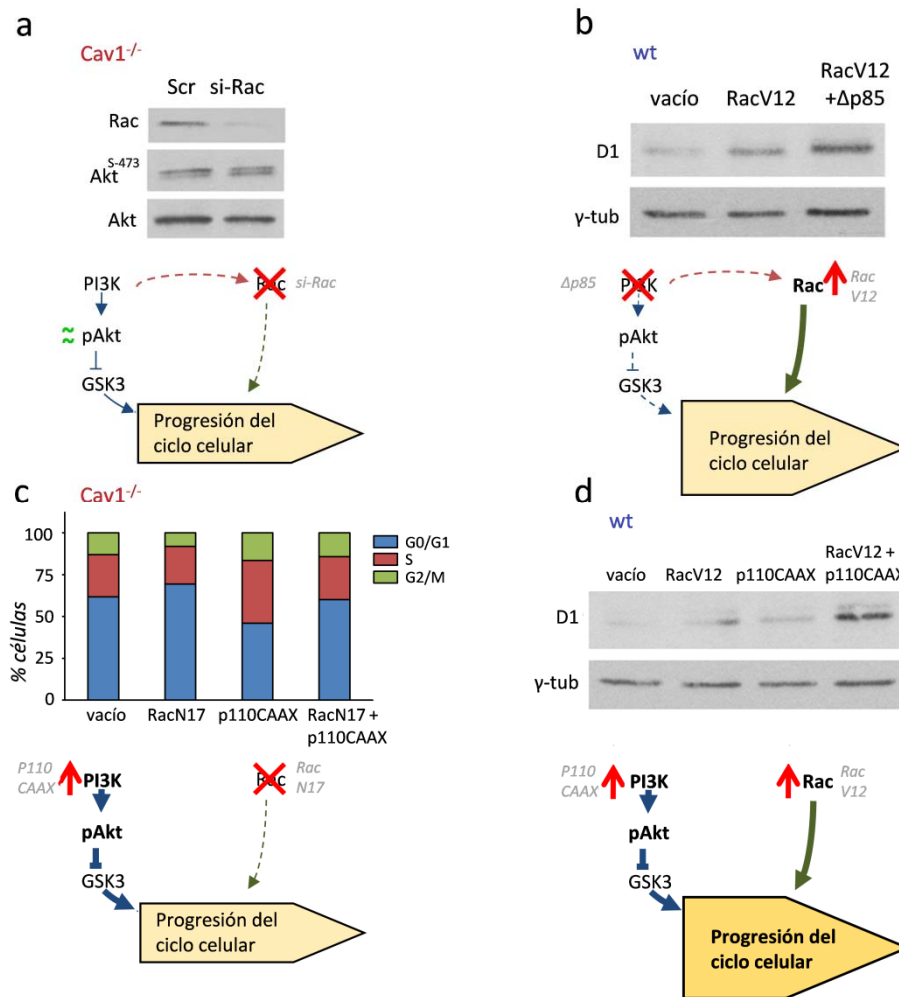


Figura R14. La activación de Rac y la vía de PI3K-Akt son rutas independientes y sinérgicas para la proliferación independiente de adhesión en células deficientes en Cav1^{-/-}. (a) En MEF-R Cav1^{-/-} se silenció transitoriamente Rac mediante un ARN de interferencia y su control (Scr, “scramble”). A las 24h se pusieron las células en suspensión en placas de agar durante 18h y se analizó por *Western-blot* la fosforilación de Akt usando anticuerpos anti-Rac, pAkt^{S473} y Akt total como control de carga. (b) MEF-R wt en los que se realizaron transfecciones transitorias con los vectores vacío y RacV12, así como una co-transfección con RacV12 y Δp85. Al día siguiente se pusieron las células en suspensión durante 18h en placas de agar. Se muestra el análisis por *Western-blot* con anticuerpos contra ciclina D1 y γ-tubulina (control de carga). (c) MEF-R Cav1^{-/-} en los que se realizaron transfecciones transitorias de los vectores vacío y codificantes para RacN17 y p110CAAX, así como la co-transfección de RacN17 y p110CAAX. Al día siguiente se pusieron la células en placas de agar durante 18h y se analizaron, por citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio, las fases del ciclo celular. Se indican los porcentajes celulares en cada fase de un total de 10.000 células analizadas. (d) Transfección transitoria de MEF-R wt con los vectores vacío y codificantes para RacV12 y p110CAAX, y co-transfección con RacV12 y p110CAAX. Al día siguiente se cultivan en placas de agar durante 18h y se analizan por *Western-blot* con anticuerpos contra ciclinaD1 y γ-tubulina (control de carga). *RacV12*: mutante constitutivamente activo de Rac; *RacN17*: mutante dominante negativo de Rac; *Δp85*: mutante dominante negativo de la subunidad reguladora de PI3K; *p110CAAX*: mutante constitutivamente activo de la subunidad catalítica de PI3K.

Todos estos resultados indican que el crecimiento independiente de adhesión observado en las células deficientes en Cav1 es independiente de Erk, pero dependiente de la vía PI3K-Akt-GSK3 β y de la activación de Rac. Para tratar de discernir si estas dos vías de señalización están relacionadas con respecto al fenotipo del crecimiento independiente de adhesión en ausencia de Cav1, se siguieron varias estrategias. En primer lugar, se testó el efecto del silenciamiento de Rac, mediante un ARNi, sobre la activación de la vía PI3K-Akt en MEF-R Cav1^{-/-} en suspensión. Como se muestra en la figura R14a, la inhibición de Rac no afecta a la fosforilación de Akt en células deficientes en Cav1 no adheridas a sustrato, lo que podría indicar que la activación de Rac está subordinada a la fosforilación de Akt, o que ambas vías son independientes. Además, el efecto sobre los niveles de ciclina D1 del mutante constitutivamente activo de Rac (RacV12) en células wt en suspensión no se ve inhibido por la expresión del mutante dominante negativo de la subunidad reguladora de PI3K ($\Delta p85$) (figura R14b), lo que parece reforzar esta hipótesis. El hecho de que, en células Cav1^{-/-} en suspensión, la co-expresión de un mutante activo de la subunidad catalítica de PI3K (p110CAAX) y del dominante negativo RacN17 tenga un efecto intermedio y compensatorio respecto a las transfecciones simples, indicaría que ambas vías son independientes (figura R14c). Finalmente, se observó que la co-expresión de ambos mutantes activos (RacV12 y p110CAAX) en MEF-R wt en suspensión tiene un efecto aditivo sobre el aumento de la expresión de ciclina D1 (figura R14d). Por tanto, estos datos apuntan a que la activación de Rac y la vía de PI3K-Akt son rutas independientes y sinérgicas, de las que depende el crecimiento celular independiente de adhesión observado en ausencia de Cav1.

4.2.3.- El defecto en el tráfico de CEMMs, así como la translocación constitutiva de Rac a la membrana plasmática es suficiente para la progresión del ciclo celular independiente de integrinas.

Como ya se ha demostrado en trabajos previos ⁽⁴⁹⁾, las células deficientes en Cav1 presentan un defecto en la internalización de caveolas y CEMMs tras la pérdida de adhesión, proceso necesario para el silenciamiento de determinadas vías de señalización asociadas. Por tanto, se postuló que este defecto en la internalización de CEMMs podía estar implicado en el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión encontrado en células Cav1^{-/-}.

Para probar esta hipótesis, se trató de retener estos microdominios o CEMMs en la membrana plasmática de MEF-R wt en suspensión, mediante su incubación con microbolas de látex recubiertas con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB, *Cholera toxin B*). Esta toxina se une al GM1 (gangliósido de membrana), abundante en los CEMMs, e impide que sean internalizados ⁽⁴⁸⁾. En la figura R15a se observa que las regiones de membrana en contacto con las microbolas-CTxB retienen más GM1 que las bolas control, recubiertas de anticuerpos contra el receptor de transferrina (TfR, *transferrin receptor*), que está excluido de los CEMMs. Además, mediante tinción con el reactivo aerolisina, se observó que este tratamiento lleva a un

reclutamiento más eficaz de proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (figura R15b), que están asociadas a CEMMs^(94, 254). Por tanto, la incubación con microbolas de látex recubiertas de CTxB consigue retener, en parte, CEMMs en la membrana plasmática de células wt en suspensión.

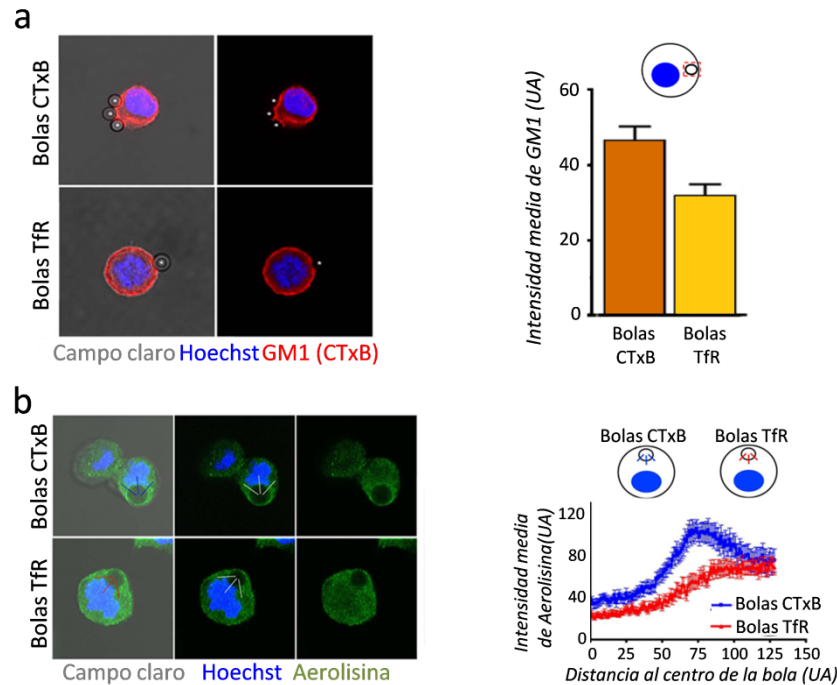


Figura R15. La incubación con microbolas recubiertas con toxina cólerica (CTxB) es capaz de retener microdominios enriquecidos en colesterol (CEMMs) en células wt en suspensión. MEF-R wt fueron incubados durante 1h con bolas recubiertas con anticuerpo contra el receptor de transferrina (TfR) o toxina cólerica (CTxB), y cultivadas en suspensión en medio con metilcelulosa durante 50 min (a) o 18h (b). **(a)** Tinción con CTxB conjugada con Alexa594 y Hoechst. Se muestra la intensidad media de GM1 del área dibujada, delimitando la microbola, de 10 células analizadas, medida con el programa LAS-AF, en unidades arbitrarias (UA). **(b)** Tinción con aerolisina e inmunofluorescencia indirecta, y Hoechst. Se representa la intensidad media en unidades arbitrarias (UA), de 10 células analizadas por cada condición.

Una vez comprobada la eficacia del tratamiento, se estudió su efecto sobre la progresión del ciclo celular independiente de adhesión. Mediante ensayos de incorporación de BrdU, se observó que MEF-R wt pre-incubados con bolas recubiertas de CTxB, y cultivados en suspensión, presentan casi el doble de células BrdU positivas que los controles incubados con bolas sin recubrimiento, o bolas-TfR (figura R16a). Este incremento en la incorporación de BrdU correlaciona con un aumento en la expresión de ciclina D1 en suspensión (figura R16b). El número de bolas unidas por célula era similar (entre 6 y 7 en ambos tratamientos) lo que excluye la posibilidad de un efecto en la proliferación debido al número de bolas unidas.

Estos datos refuerzan la hipótesis de que el defecto en la internalización de CEMMs desde la membrana plasmática induce la progresión del ciclo celular en células no adheridas a sustrato.

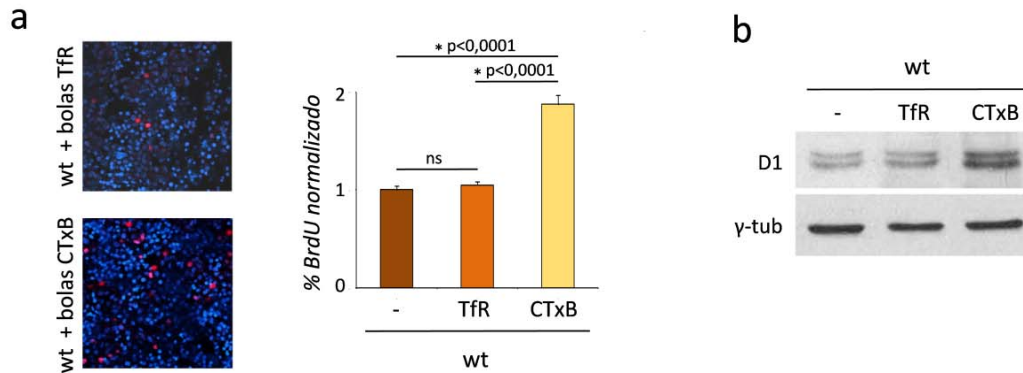


Figura R16. La retención de CEMMs en membrana plasmática provoca la proliferación independiente de adhesión en células wt. MEF-R wt fueron incubados durante 1h con bolas recubiertas con anticuerpo contra el receptor de transferrina (TfR) o toxina colérica (CTxB), y cultivadas en suspensión en medio con metilcelulosa durante 18h. (a) Análisis del BrdU incorporado durante 5h. Se muestran los porcentajes de células BrdU positivas, de un total de 5.000 células analizadas. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes. (b) Análisis de *Western-blot* con anticuerpos dirigidos contra ciclina D1 y γ -tubulina como control de carga.

Puesto que la internalización de CEMMs en suspensión ha sido relacionada con un descenso de la localización de Rac en la membrana plasmática, asociado a una disminución de la activación de la vía Rac-PAK⁽⁴⁸⁾, se procedió al análisis del efecto de la translocación constitutiva de Rac a membrana sobre la progresión del ciclo celular en MEF-R wt en suspensión. Para ello, estas células se transfectaron transitoriamente con 2 construcciones que contenían la secuencia de Rac fusionada a secuencias de translocación a membrana, como son la región transmembrana del receptor de IL-2 en un caso (IL2-Rac) y a la secuencia de miristoilación de Src (myr-Rac) en el otro. Ambas construcciones muestran una localización predominante en la membrana celular⁽⁵¹⁾ (figura R17a).

Como se muestra en la figura R17b, MEF-R wt que expresan cualquiera de estas dos construcciones presentan mayores niveles de ciclinas D1 y A que las células transfectadas con un vector vacío, en suspensión. Además, esto va acompañado de una disminución en el porcentaje de células en fase G0/G1 (figura R17c).

Por tanto, estos datos sugieren que el aumento de proliferación en células deficientes en Cav1, así como su capacidad de crecer independientemente de la adhesión, es debido a la mayor proporción de Rac activo en CEMMs, lo que lleva a una mayor expresión de ciclinas D1 y A y a la consiguiente progresión a través de la fase G1 del ciclo celular, provocando el fallo en el arresto del ciclo celular tras la pérdida de adhesión a sustrato.

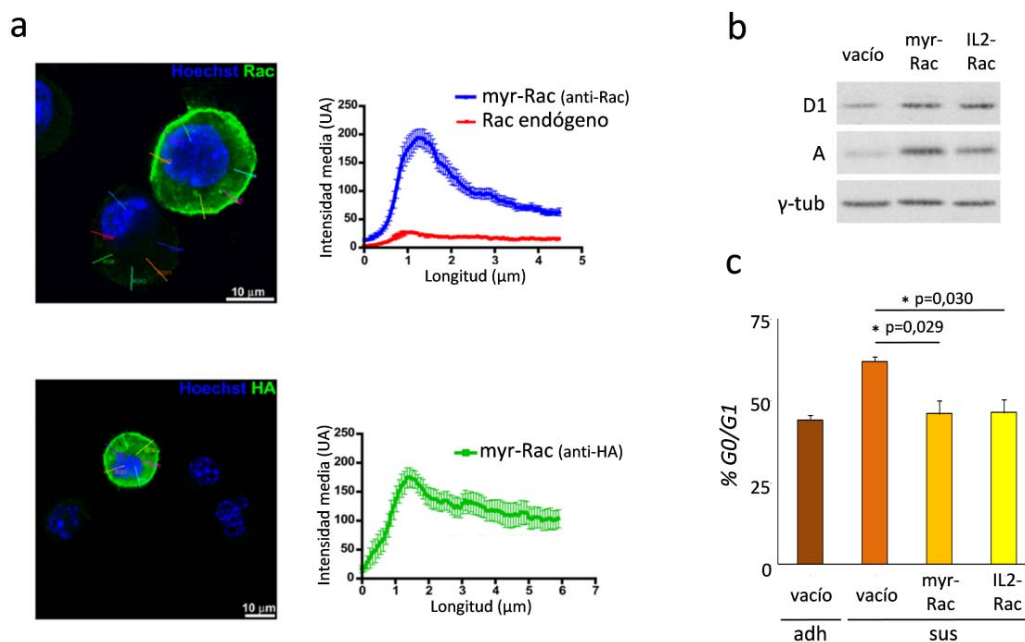


Figura R17. La translocación constitutiva de Rac a la membrana plasmática es capaz de llevar al crecimiento independiente de adhesión. MEF-R wt fueron transfectados transitoriamente mediante electroporación con un vector vacío o construcciones de Rac de localización en membrana (myr-Rac e IL2-Rac). A las 24h se pusieron en adhesión (plástico) y suspensión (agar) durante 18h. **(a)** Inmunofluorescencia indirecta de la construcción myr-HA-Rac, con anti-Rac, anti-HA y *Hoechst* para marcar los núcleos. Se representa la intensidad media en unidades arbitrarias (UA) de 30 células, medida con el programa *LAS-AF*. **(b)** Análisis por *Western-blot*, utilizando anticuerpos anti- ciclina D1, ciclina A y γ -tubulina (control de carga). **(c)** Análisis por citometría de flujo tras tinción con yoduro de propidio de la fase G0/G1 del ciclo celular. Se indican los porcentajes celulares de un total de 10.000 células analizadas. Las barras en (a) y (c) representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos.

4.2.4.- Rac y Rho tienen efectos antagónicos en la regulación del ciclo celular dependiente de adhesión.

Se ha demostrado en estudios previos que Rho-GTPasa es capaz de reprimir la expresión de ciclina D1 en quiescencia y en la fase G1 temprana, contrarrestando la inducción mediada por Rac⁽³⁰³⁾. Por otra parte, se observó que la actividad de Rho es menor en células deficientes en Cav1⁽⁹⁵⁾. Dado que las funciones de Rho y Rac son antagónicas^(24, 95, 303), se analizó el efecto de la restauración de la activación de Rho en MEF-R Cav1^{-/-}, mediante la expresión del mutante constitutivamente activo RhoV14. Como se muestra en la figura R18, la activación de Rho disminuye drásticamente la expresión de ciclina D1 en células deficientes en Cav1, tanto tras la privación de suero (fig R18a), como tras la pérdida de adhesión (figura R18b). Esto confirma que Rac y Rho ejercen efectos antagónicos sobre la regulación del ciclo celular, y refuerza la implicación de Rac en el fenotipo hiperproliferativo en células deficientes en Cav1.

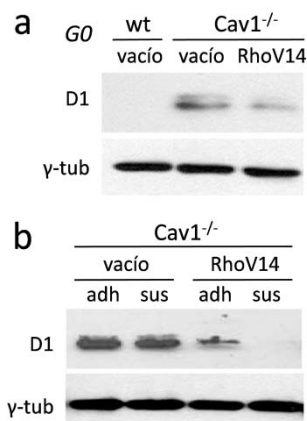


Figura R18. *La activación de Rho recupera el arresto de células deficientes en Cav1 tras la privación de suero o la pérdida de adhesión.* MEF-R wt y Cav1^{-/-} fueron transfectados transitoriamente mediante electroporación con un vector vacío o con un plásmido que contenía la forma constitutivamente activa RhoV14. **(a)** A las 24 h fueron arrestados por privación de suero durante 72h. **(b)** A las 24h fueron cultivados en adhesión o en placas de agar durante 18h. Se muestran en (a) y (b) el análisis por *Western-blot* utilizando anticuerpos contra ciclina D1 y γ -tubulina como control de carga.

4.2.5.- La internalización de CEMMs y el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión son dependientes de Cav1 pero independientes de la formación de caveolas.

Por otra parte, se quiso comprobar si el papel de Cav1 en el crecimiento independiente de adhesión está restringido a su capacidad de formar caveolas. Dado que ha sido descrito que PTRF (Cavina-1) es necesaria junto con Cav1 para la formación de caveolas⁽¹¹³⁾, se utilizaron MEFs extraídos de un ratón deficiente en PTRF^{-/-} como modelo de un contexto en el que estuviera presente la Cav1 pero no se formaran caveolas. En la figura R19a se muestra que Cav1 se expresa en MEFs PTRF^{-/-}, aunque sus niveles están disminuídos, probablemente debido al papel de PTRF en la estabilización e inmovilización de esta proteína⁽¹¹³⁾. Se cultivaron MEF-D wt y Cav1^{-/-} y MEFs PTRF^{-/-} en suspensión durante 18h en medio con metilcelulosa, y se observó que, mientras que las células Cav1^{-/-} presentan un menor porcentaje celular en fase G0/G1 y mayor proporción en fases S y G2/M (figura R8a, 19b), los MEFs deficientes en PTRF presentan porcentajes similares al wt, indicando que la capacidad de crecimiento independiente de adhesión es independiente de la formación de caveolas, pero no de la presencia de Cav1.

Puesto que, como se ha mostrado anteriormente, el crecimiento celular dependiente de adhesión está regulado por la internalización de CEMMs (figura R16), se estudió este proceso en células deficientes en PTRF, y por tanto deficientes en caveolas⁽¹¹³⁾. Así, se cuantificaron los niveles de CEMMs en la membrana plasmática en MEFs wt, Cav1^{-/-} y PTRF^{-/-} cultivados en suspensión. Para ello, las células se sembraron en medio con metilcelulosa y, a diferentes tiempos, se procedió al marcaje con CTxB-594 de los CEMMs que permanecían retenidos en la superficie celular, ya que esta toxina se une a GM1 y es incapaz de atravesar la membrana plasmática. Una vez teñidas y fijadas las células, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de CTxB en su superficie celular. El tiempo 0 indica la cantidad de GM1 en membrana justo al

perder la adhesión a MEC. Como se muestra en las figuras R19c y d, mientras que las células Cav1^{-/-} en suspensión retienen mayor cantidad de CEMMs, las células PTRF^{-/-} endocitan estos microdominios tan eficazmente como las células wt, indicando que la internalización de CEMMs está modulada por Cav1 en un mecanismo independiente a la formación de caveolas. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el defecto en la internalización de CEMMs desde la membrana plasmática induce la progresión del ciclo celular en células no adheridas a sustrato.

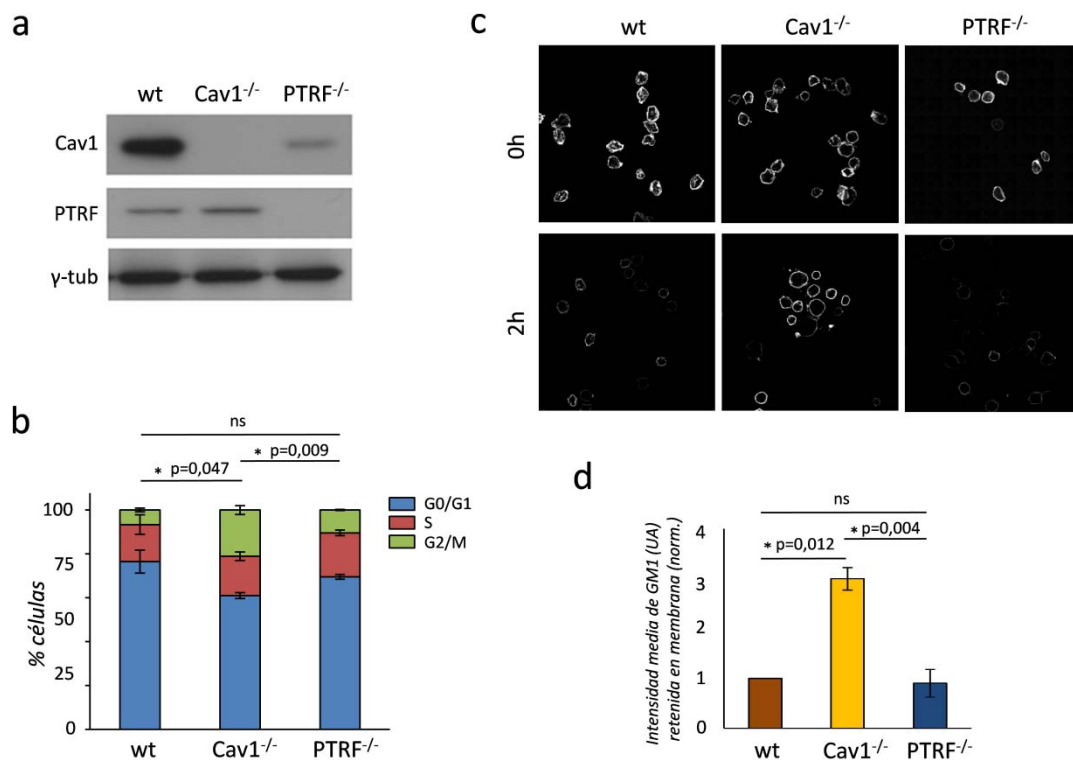


Figura R19. La internalización de CEMMs y el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión son dependientes de Cav1 pero independientes de la formación de caveolas. (a) análisis por *Western-blot* de la expresión de Cav1 y PTRF en MEFs wt, Cav1^{-/-} y PTRF^{-/-} (γ-tubulina usado como control de carga). (b) MEFs wt, Cav1^{-/-} y PTRF^{-/-} fueron cultivados en suspensión en medio con metilcelulosa durante 18h. Se muestra el análisis por citometría de flujo de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular. Se indican los porcentajes celulares en cada fase de un total de 10.000 células analizadas. (c) MEFs wt, Cav1^{-/-} y PTRF^{-/-} fueron despegados de sustrato, e inmediatamente incubados con CTxB conjugada con Alexa-594 durante 30 min a 4°C, para impedir su internalización. Posteriormente se fijaron (t=0) o se pusieron en suspensión durante 2h (t=2). (d) Cuantificación de la intensidad de GM1 retenida en membrana, tras 2h en suspensión, normalizada con respecto al t=0, de un total de 15 células por condición, medida con el programa *ImageJ*, en unidades arbitrarias (UA). Las barras en (b) y (d) representan medias ± error estándar de las medias de 3 experimentos.

4.2.6.- La fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 regula la proliferación dependiente de adhesión.

Dado que el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión en células deficientes en Cav1 es debido al defecto en el tráfico de CEMMs, y que la internalización de estos dominios tras la pérdida de adhesión por integrinas es dependiente de la fosforilación de Cav1 en su tirosina-14, a pesar de no afectar la capacidad de formación de caveolas⁽⁴⁹⁾, se postuló que esta fosforilación está implicada en la regulación de la progresión del ciclo celular dependiente de adhesión. Para comprobar esta hipótesis, se restableció la expresión de Cav1 en MEF-R Cav1^{-/-} tanto con Cav1-wt como con una Cav1 mutante, en la que la tirosina-14 (Y14) ha sido sustituida por fenilalanina (F) y por tanto no es capaz de ser fosforilada en esta posición (Cav1^{Y14F}). Estas células se sembraron en agar blando, y en 2 semanas se observó que, si bien en los MEFs Cav1^{-/-} reconstituídos con Cav1-wt la capacidad de formación de colonias se ve drásticamente reducida, los que expresan Cav1^{Y14F} mantienen esta capacidad (figura R20). Esto permite confirmar que la fosforilación de Cav1 en Y14 es necesaria para el control del crecimiento celular dependiente de adhesión.

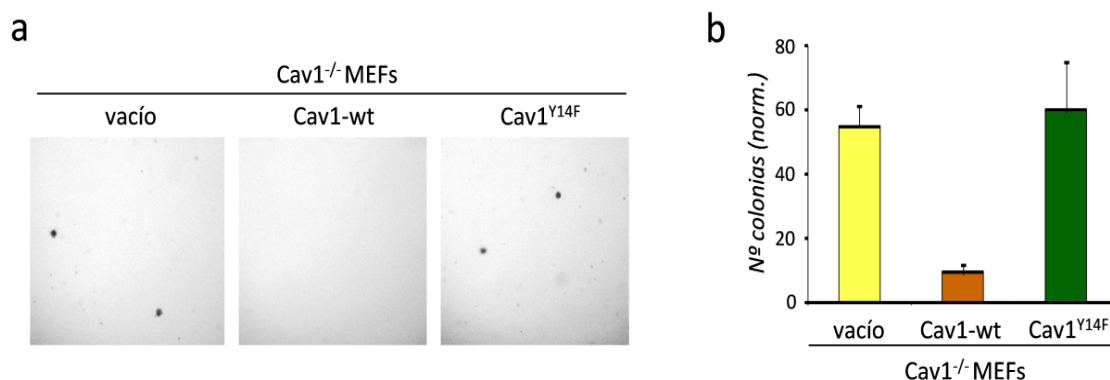


Figura R20: La fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 regula la formación de colonias en agar blando. (a) MEFs Cav1^{-/-} reconstituídos de manera estable con un vector vacío, Cav1-wt o el mutante no fosforilable (Cav1^{Y14F}) fueron sembrados en agar blando durante 2 semanas, teñidos con cristal violeta y fotografiados. (b) Número de colonias formadas en agar blando por MEFs tratados como en (a).

Para un análisis más detallado, se cultivaron en suspensión, durante 18h, MEF-R Cav1^{-/-} reconstituídos tanto con un vector vacío, como con Cav1-wt y con Cav1^{Y14F}. Mediante ensayos de incorporación de BrdU se observó que, en estas condiciones, mientras que la re-expresión de Cav1-wt conduce a la disminución de la proporción de células en fase S, los MEFs que expresan Cav1^{Y14F} presentan un porcentaje celular en esta fase similar a los deficientes en Cav1 (figura R21), indicando su incapacidad para rescatar el fenotipo de estas células. De igual manera, se comprobó que tanto los niveles de expresión de ciclinas D1 y A, como los de p107 son similares a los de las células Cav1^{-/-}, y están elevados respecto a los de las células que expresan Cav1-wt

(figura R21). En la misma línea, la expresión de pRb es similar en células Cav1^{-/-} y células que expresan Cav1^{Y14F} (figura R21).

Por tanto, la fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 modula la proliferación celular dependiente de integrinas, presumiblemente mediante la regulación de la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión.

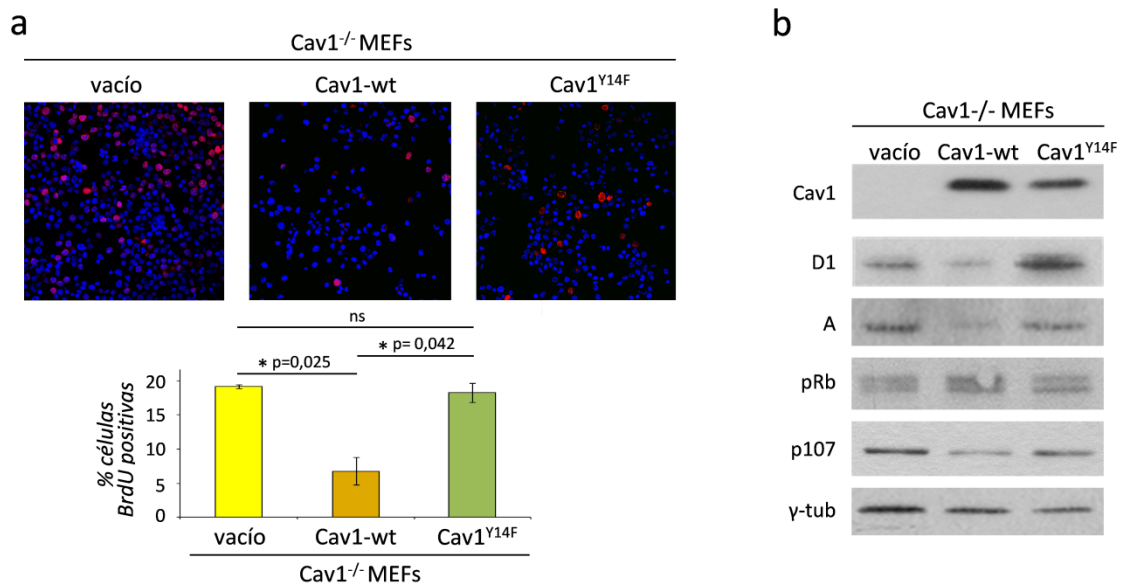


Figura R21: La fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 regula la capacidad de crecimiento independiente de adhesión. **(a)** MEFs Cav1^{-/-} reconstituídos de manera estable con un vector vacío, Cav1-wt o el mutante Cav1^{Y14F} fueron cultivados en suspensión durante 18h en medio con metilcelulosa, en constante rotación, y posteriormente marcados durante 2h en presencia de BrdU. Se muestra el porcentaje de células BrdU positivas, analizado por inmunofluorescencia. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes. **(b)** MEFs Cav1^{-/-} reconstituídos de manera estable con un vector vacío, Cav1-wt o Cav1^{Y14F} fueron cultivados en placas de agar durante 18h. Análisis por *Western-blot* usándose anticuerpos dirigidos contra Cav1, Ciclina D1, Ciclina A, pRb, p107, y γ -tubulina (como control de carga).

4.3.- Generación y caracterización de un nuevo modelo murino *knock-in* de expresión de Cav1 no fosforilable (Cav1^{Y14F}).

4.3.1.- Generación de las nuevas estirpes Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y}.

La fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 está implicada en múltiples procesos, como la internalización de caveolas mediada por integrinas ⁽⁴⁹⁾, la regulación de adhesiones focales ^(82, 186), la migración direccional ⁽⁹⁵⁾ y procesos metastásicos ⁽⁹¹⁾. Además, como se ha mostrado previamente, esta fosforilación es necesaria para la proliferación celular dependiente de adhesión.

Los ratones deficientes en Cav1, a pesar de ser viables y fértiles, presentan alteraciones en múltiples sistemas ⁽¹⁴⁴⁾. Dada la complejidad estructural de Cav1, y las distintas funciones desempeñadas por diferentes dominios de esta proteína, resulta de gran importancia el estudio del papel específico de la fosforilación en Y14 en diferentes procesos a un nivel fisiológico y sistémico. Por tanto, se decidió generar un nuevo modelo murino que expresara la proteína mutante no fosforilable Cav1^{Y14F}.

Para ello se creó un vector que contuviera la mutación, y permitiera su integración en el genoma del ratón por recombinación homóloga (figura R22). El vector de origen fue pBH48 ⁽²¹⁵⁾, derivado del plásmido pPNT, que contiene una caja PGK-neo-stop flanqueada por sitios *LoxP*, lo que permite su escisión mediada por Cre-recombinasa (figura R22; *Materiales y Métodos*). Esta caja contiene diversos codones de terminación, así como el gen codificante para la resistencia a neomicina, bajo el promotor constitutivo de la fosfoglicerato- quinasa (PGK).

En este vector se subclonó, flanqueando la caja PGK-neo-stop, un fragmento de 5,1 Kb (“fragmento izquierdo”) de ADN que contenía el exón 1, el promotor y secuencias “corriente arriba” de *cav1* de ratón, y un fragmento de 3 Kb (fragmento derecho) que contenía el exón 2 modificado y el intrón 2 de *cav1* (figura R22; *Materiales y Métodos*). De esta manera, los exones 1 y 2 de *cav1* quedan separados por la caja PGK-neo-stop. La modificación introducida en el exón 2 fue la sustitución, por mutagénesis dirigida, del codón *TAC*, que codifica la tirosina en posición 14, por *TTC*, que codifica para fenilalanina. Al vector resultante se le llamó pMG19 (figura R22; *Materiales y Métodos*).

La estrategia consiste en que, una vez integrada en el genoma por recombinación homóloga, esta construcción detiene la traducción de la proteína Cav1, debido a los codones de terminación codificados en la caja PGK-neo-stop. Esto lleva a la expresión truncada de la proteína, comportándose el ratón como un *knockout* funcional. Sin embargo, tras la escisión de la caja

PGK-neo-stop por recombinación mediada por Cre, se permite la expresión de la proteína mutada Cav1^{Y14F}, generándose así el ratón *knock-in* (figura R22).

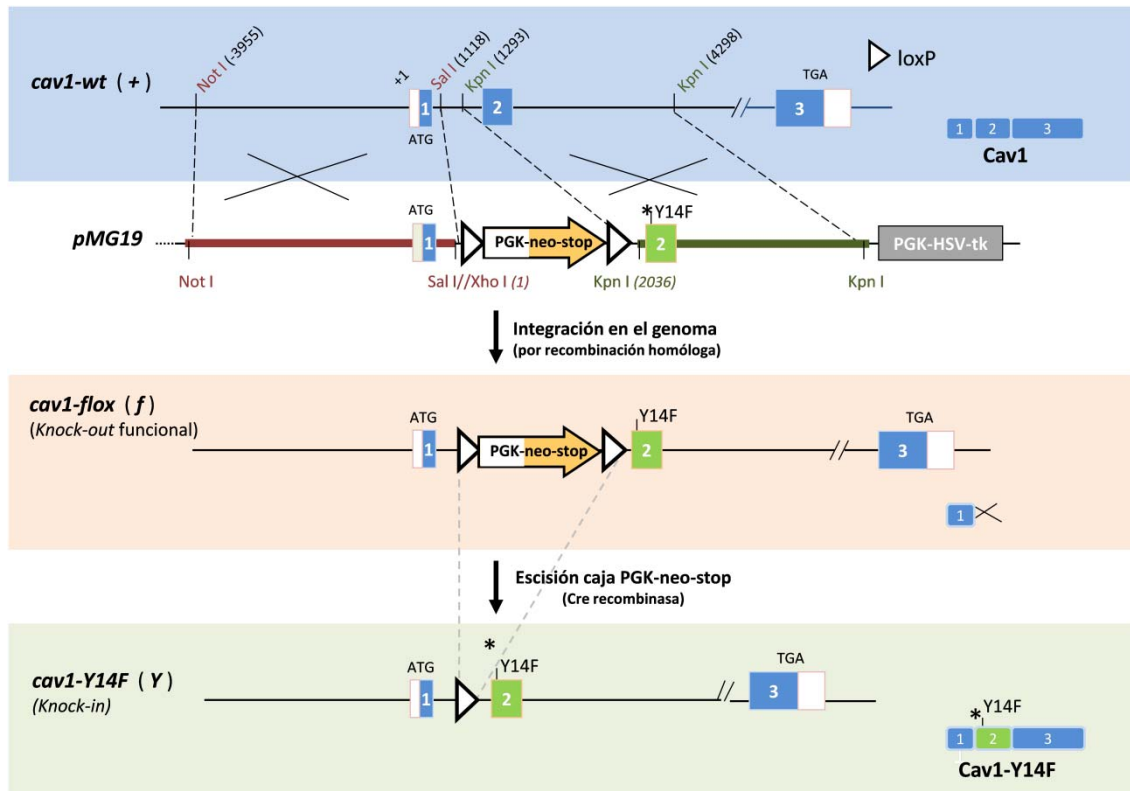


Figura R22: Estrategia de generación de los alelos *cav1-flox* y *cav1-Y14F*. Se muestra la estructura de los 3 alelos diferentes de *cav1* (*cav1-wt*, *cav1-flox* y *cav1-Y14F*), así como la de las proteínas que codifican. La estrategia consiste en la generación del vector *pMG19*, que contiene la caja PGK-neo-stop, flanqueada por sitios loxP y por secuencias del gen *cav1* con la mutación deseada (Y14F). Esto permite la integración de la construcción en el genoma por recombinación homóloga. De esta manera, se obtiene el alelo *cav1-flox*, que se comporta como un *knock-out* funcional, debido a la terminación prematura de la traducción gracias a los codones stop contenidos en la caja PGK-neo-stop. Posteriormente se escinde esta caja por recombinación mediada por Cre-recombinasa que corta por los sitios loxP, de forma que se genera el alelo *cav1-Y14F*, que codifica para la proteína mutante no fosforilable. Se indican los sitios de restricción usados para el clonaje, así como sus posiciones (números en negro para el ADN genómico, y en color para las posiciones dentro del vector).

Una vez generado el vector *pMG19*, y para conseguir que la construcción que contenía se integrara en el genoma murino, se procedió a su electroporación en células madre embrionarias de ratón (*ES cells*, clon R1), con fondo genético *129X/SvJ x 129S1*. Posteriormente, se testó su integración por recombinación homóloga en el genoma, mediante selección positiva con neomicina (G418) y selección negativa con ganciclovir. Los clones seleccionados se verificaron por *Southern-blot*, mediante digestión con *Eco RV* del ADN genómico e hibridación con una sonda dirigida contra una secuencia *downstream* ("corriente abajo") del fragmento derecho (figura R23). Se obtuvo un clon positivo de células ES de un total de 442 colonias testadas.

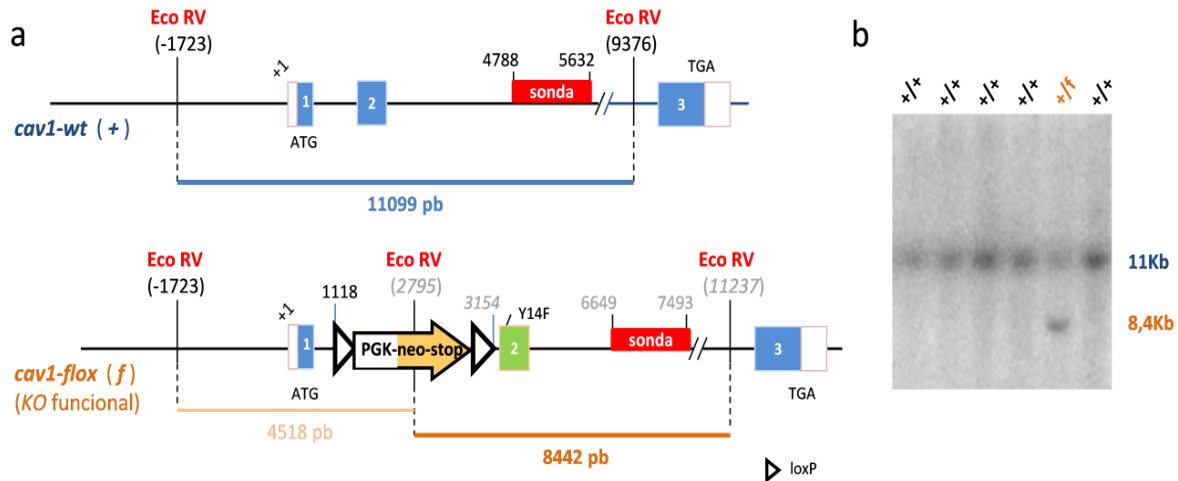


Figura R23: Obtención del alelo *cav1-flox*. Tras la electroporación del vector pMG19 en células ES, se seleccionaron clones mediante resistencia a neomicina (selección positiva) y ganciclovir (selección negativa). En los clones obtenidos se testó la integración de la construcción en el genoma por recombinación homóloga, mediante digestión del ADN genómico con *EcoRV*. **(a)** Esquema de la estrategia de verificación. Tras digestión con *EcoRV* se genera a partir del alelo *cav1-wt* un fragmento de 11Kb, que desaparece en el alelo *cav1-flox*, al introducirse un sitio de restricción extra (contenido en la caja PGK-neo-stop). De esta manera, se generan a partir de este alelo fragmentos de 4,5 y 8,4Kb. Se indican las dianas *EcoRV* en ambos alelos, así como sus posiciones y la de la sonda utilizada (cuadrado rojo) que hibrida con una región contenida dentro de dichos fragmentos. **(b)** Análisis por *Southern-blot* de diferentes clones tras digestión con *EcoRV* e hibridación de la sonda mostrada en (a). Se obtuvo un clon positivo de 442 colonias testadas.

Posteriormente, se microinyectaron las células ES positivas en blastocistos con fondo genético *C57BL/6 (H)*, que después fueron implantados en hembras pseudogestantes, para la obtención de quimeras murinas. Cuatro de estos ratones quiméricos fueron retrocruzados, a su vez, con hembras *C57BL/6 (H)*, resultando que dos de ellos transmitieron la construcción a la descendencia. Los ratones heterocigotos de esta generación fueron denominados *Cav1^{+/-}*, siendo los fundadores de la colonia *Cav1^{f/f}*.

Para conseguir la escisión de la caja PGK-neo-stop, se cruzaron ratones *Cav1^{f/f}*, con hembras *Sox2-Cre*. Esta recombinasa es de expresión en el epiblasto, por lo que los ratones descendientes la expresan de manera ubicua en sus tejidos. Así, se obtuvieron ratones *Cav1^{+/-Y}*, en los que se testó la escisión de la caja PGK-neo-stop en diversos tejidos mediante PCR (figura R24). Se consigue así una colonia de ratones que expresan la proteína mutante no fosforilable *Cav1^{Y14F}*.

Tanto los ratones *Cav1^{f/f}* como los ratones *Cav1^{Y/Y}* son viables, fértiles y aparecen en proporciones mendelianas.

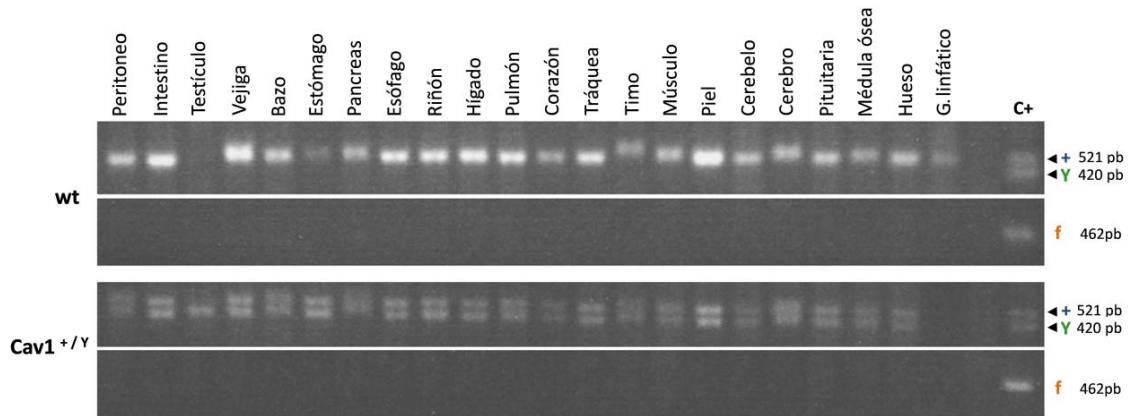


Figura R24: La escisión de la caja PGK-neo-stop se produce correctamente en diferentes tejidos. Se muestra la imagen de geles de agarosa en los que aparecen los diferentes fragmentos de amplificación, correspondientes a los alelos *cav1*-wt (+), *cav1*-flox (f) y *cav1*-Y14F (Y) obtenidos por PCR con cebadores específicos a partir de ADN de diferentes tejidos de ratones wt y Cav1^{+Y}.

4.3.2.- Validación del modelo: caracterización de MEFs.

4.3.2.1.- Expresión de caveolinas en MEFs Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y}.

A continuación se extrajeron MEFs wt, Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y} a partir de embriones de las camadas resultantes de cruces de heterocigotos Cav1^{+f} y Cav1^{+Y}. En primer lugar se testó la expresión de Cav1 en estas células, y se observó que los MEFs Cav1^{f/f} no expresan Cav1, ya que esta proteína aparece truncada por la terminación prematura debido a la caja PGK-neo-stop (figura R25a). En cuanto a la expresión de Cav1^{Y14F} en MEFs Cav1^{Y/Y}, sus niveles son similares a los de Cav1 en células wt (figura R25b). La expresión de Cav2 se ve disminuída en los MEFs Cav1^{f/f}, mientras que no aparece afectada en los que expresan Cav1^{Y14F} (figura R25).

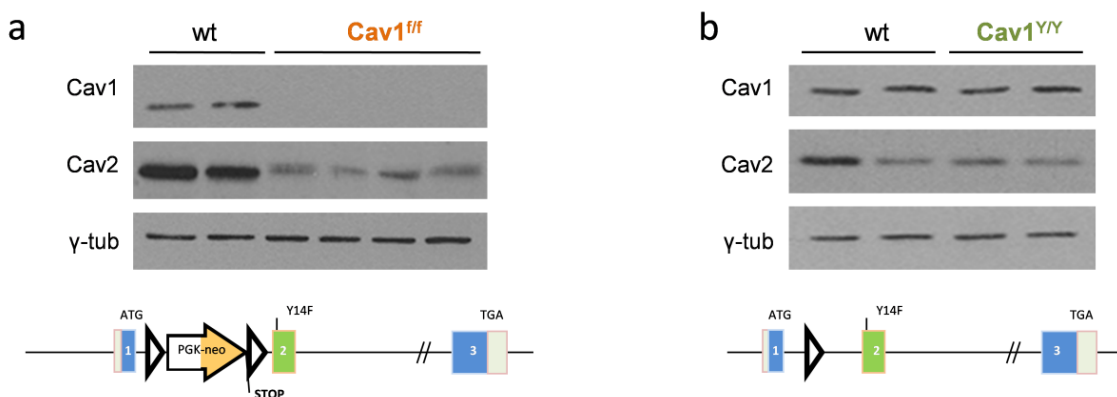


Figura R25: Análisis de la expresión de caveolinas en MEFs primarios. (a) Análisis por Western-blot de los niveles de Cav1 y Cav2 en diferentes clones de MEFs primarios wt y Cav1^{f/f} primarios (γ-tubulina usado como control de carga). (b) Análisis por Western-blot de los niveles de Cav1 y Cav2 en diferentes clones de MEFs wt y Cav1^{Y/Y} primarios (γ-tubulina como control de carga).

Para confirmar la validez del modelo, se comprobó si la Cav1^{Y14F} expresada era capaz de ser fosforilada. Para ello, se incubaron MEFs wt, Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y} con pervanadato sódico, que inhibe la actividad fosfatasa. De esta manera, se consigue potenciar la fosforilación de Cav1. Se observó que mientras que Cav1-wt sí se fosforila, Cav1^{Y14F} no es capaz de ser fosforilada tras el estímulo (figura R26), por lo que queda confirmado que estos ratones expresan de manera correcta la proteína mutante no fosforilable.

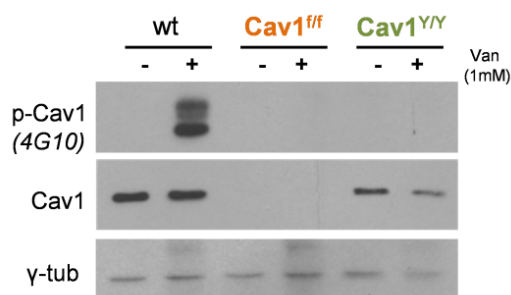


Figura R26: Análisis de la fosforilación de Cav1 y Cav1^{Y14F} en MEFs primarios. MEFs wt, Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y} primarios fueron cultivados en ausencia o presencia de pervanadato (1mM). Posteriormente, se inmunoprecipitó la proteína Cav1, y se analizó por *Western-blot* su fosforilación usando el anticuerpo fosfo-tirosina específico 4G10, así como los anticuerpos contra Cav1 y γ -tubulina como controles de carga.

4.3.2.2.- La proliferación celular está aumentada en células Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y}.

Como ya se ha mostrado previamente en este trabajo, la ausencia de Cav1 acelera la proliferación celular. Para comprobar el comportamiento proliferativo de las nuevas células deficientes en Cav1 (Cav1^{ff}), así como el de las células que expresan Cav1 mutante (Cav1^{Y/Y}), se estudió, en una primera aproximación, la proporción de células mitóticas de los tres genotipos, en cultivos asincrónicos.

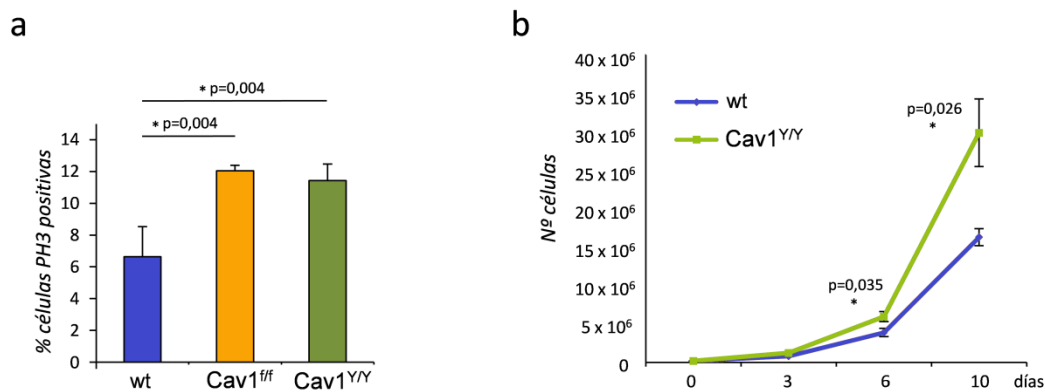


Figura R27: La proliferación celular está aumentada en MEFs primarios Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y}. (a) Análisis del porcentaje de células en fase de mitosis, mediante inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo anti-pH3, y *Hoechst* (para marcar núcleos) en cultivos asincrónicos de MEFs primarios wt, Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y}. (b) Curva de crecimiento de MEFs primarios wt y Cav1^{Y/Y}, sembrados a una densidad de 5×10^5 en placas de 60mm y contados a los 3, 6 y 10 días. Las barras en (a) y (b) representan medias \pm error estándar de las medias de 3 experimentos independientes.

Para ello, se sembraron en adhesión MEFs wt, Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y} y se comprobó que tanto las células que no expresan Cav1, (Cav1^{ff}), como las que expresan la proteína mutante, (Cav1^{Y/Y}), presentan un aumento de casi el doble en el porcentaje de células en fase M, con respecto a las wt (figura R27a). Además, se observó que MEFs Cav1^{Y/Y} tienen una mayor tasa de proliferación que las wt (figura R27b). Estos datos confirman los fenotipos hiperproliferativos previamente observados en líneas celulares Cav1-deficientes procedentes de otros modelos y en las reconstituídas con Cav1^{Y14F}.

4.3.2.3.- Los MEFs primarios Cav1^{Y/Y} presentan una desregulación de la internalización de CEMMs en suspensión.

Como se ha comentado previamente, la fosforilación de Cav1 en Y14 está implicada en la modulación de la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión por integrinas⁽⁴⁹⁾. Dado que esta observación fue realizada en MEFs Cav1^{-/-} reconstituídos transitoriamente con Cav1^{Y14F}⁽⁴⁹⁾, se decidió comprobar si esto mismo ocurría en el nuevo sistema, en el que la expresión de Cav1^{Y14F} es endógena. Así, se incubaron MEFs wt y Cav1^{Y/Y} con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) que se une al gangliósido GM1, usado como marcador de CEMMs. Posteriormente se pusieron las células en suspensión y, a los tiempos requeridos, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de CTxB retenida en membrana plasmática. Los niveles iniciales de marcaje de CTxB son similares en ambos genotipos (figura R28a y b), pero se observó que en MEFs wt, a tiempo 15min los niveles de CTxB en membrana plasmática se ven claramente disminuidos (figura R28a y b), debido a su internalización y acumulación dentro de la célula, mientras que en los MEFs que expresan la proteína mutante se observa un retraso significativo en la internalización de CTxB (figura R28a y b).

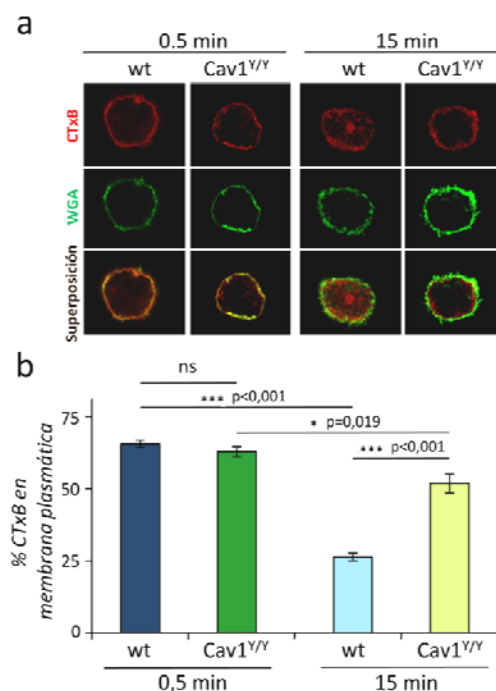


Figura R28: MEFs Cav1^{Y/Y} presentan un retraso en la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión a sustrato. **(a)** MEFs wt y Cav1^{Y/Y} fueron incubados con CTxB-594 durante 30min a 4°C, y posteriormente puestos en suspensión durante los tiempos indicados. Tras ser fijados, se tiñeron con WGA-488, para marcar la membrana plasmática. **(b)** Cuantificación del porcentaje de CTxB en membrana plasmática, tras los tiempos de suspensión indicados, a partir de imágenes obtenidas como en (a), utilizando el programa *ImageJ*. Las barras representan medias \pm error de un total de 15 células analizadas por punto.

Estos datos, obtenidos en un sistema de expresión endógena de Cav1^{Y14F}, confirman que la fosforilación de Cav1 en su residuo Y14 regula la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión a MEC y permiten, junto con los resultados previamente expuestos, confirmar la validez del sistema Cav1^{Y/Y}.

4.3.3.- Caracterización del fenotipo cardiaco de ratones Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y}.

4.3.3.1.- Expresión de Cav1 y Cav1^{Y14F} en corazón.

A pesar de que se ha descrito que en el corazón del animal adulto la expresión de Cav1 está restringida a las células endoteliales y fibroblastos intersticiales, trabajos recientes apuntan a una posible expresión de Cav1 en cardiomiocitos^(43, 110, 205). Se decidió, por tanto, analizar en primer lugar el patrón de expresión de Cav1 en corazón. Se observó, por inmunofluorescencia en secciones de corazón de ratones wt que, si bien la expresión de Cav1 se encuentra principalmente asociada a los capilares y paredes de la vasculatura cardiaca, también se detecta en pequeñas cantidades en cardiomiocitos (figura R29). Esto refuerza la observación previa de otros autores de que la expresión de Cav1 no se dé sólo en células endoteliales y fibroblastos en el corazón^(43, 110, 205). Además, se observó que esta distribución es similar en los animales Cav1^{Y/Y} (figura R29), por lo que la mutación en Y14 no afecta al patrón de expresión y localización de Cav1 en corazón.

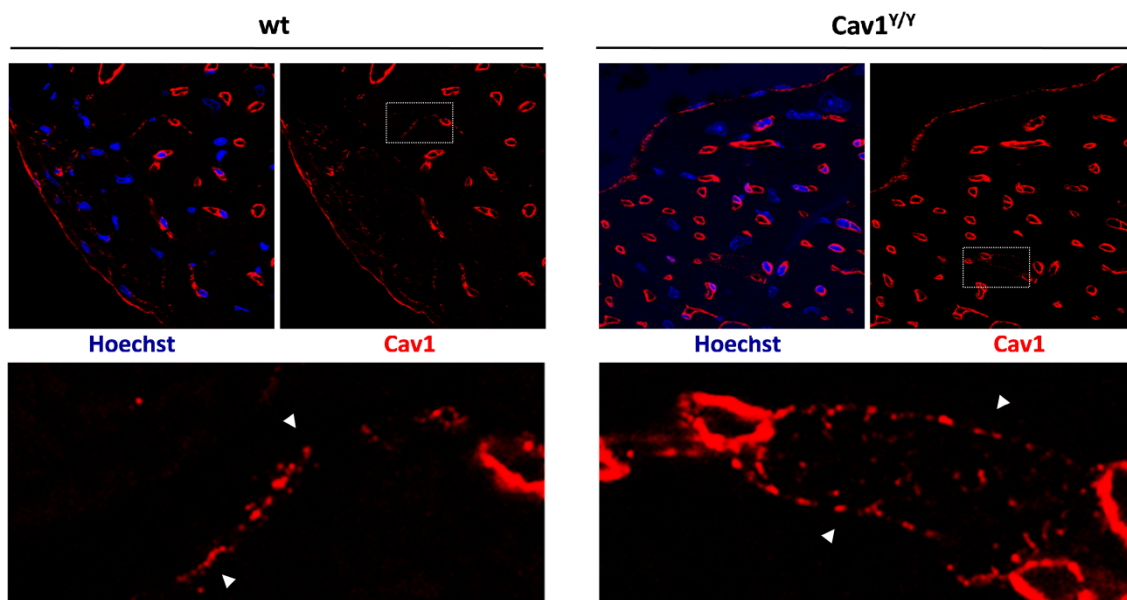


Figura R29: Expresión de Cav1 en corazones Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y}. Secciones de 5µm de corazones incluidos en parafina fueron teñidas por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo anti-Cav1, y *Hoechst* para marcar núcleos. Se muestran las imágenes de corazones wt y Cav1^{Y/Y} a 63 aumentos, así como una ampliación de la zona recuadrada. Se observa que Cav1 se expresa principalmente en células endoteliales, aunque también parece expresarse, en pequeñas cantidades, en cardiomiocitos.

4.3.3.2.- Los corazones $Cav1^{ff}$ pero no los $Cav1^{Y/Y}$, presentan disfunción sistólica y el ventrículo izquierdo dilatado, a pesar de que en ambos los cardiomiocitos son hipertróficos.

Se han descrito múltiples alteraciones cardíacas en los diferentes modelos de ratones $Cav1^{-/-}$ existentes. Si bien en todos ellos se han encontrado disfunciones sistólicas, aparecen diversos cambios morfométricos en los diferentes modelos, desde una hipertrofia en el ventrículo izquierdo, hasta una cardiomiopatía dilatada (11, 32, 315, 325). Debido a esta heterogeneidad encontrada en los diferentes modelos $Cav1^{-/-}$, y a la complejidad estructural y funcional de $Cav1$, se decidió estudiar el fenotipo cardíaco en los nuevos modelos generados, $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{Y/Y}$, para intentar dilucidar qué posibles alteraciones son las predominantes en ratones deficientes en $Cav1$, y discernir si éstas son dependientes de la presencia de $Cav1$, o de su capacidad de ser fosforilada en Y14.

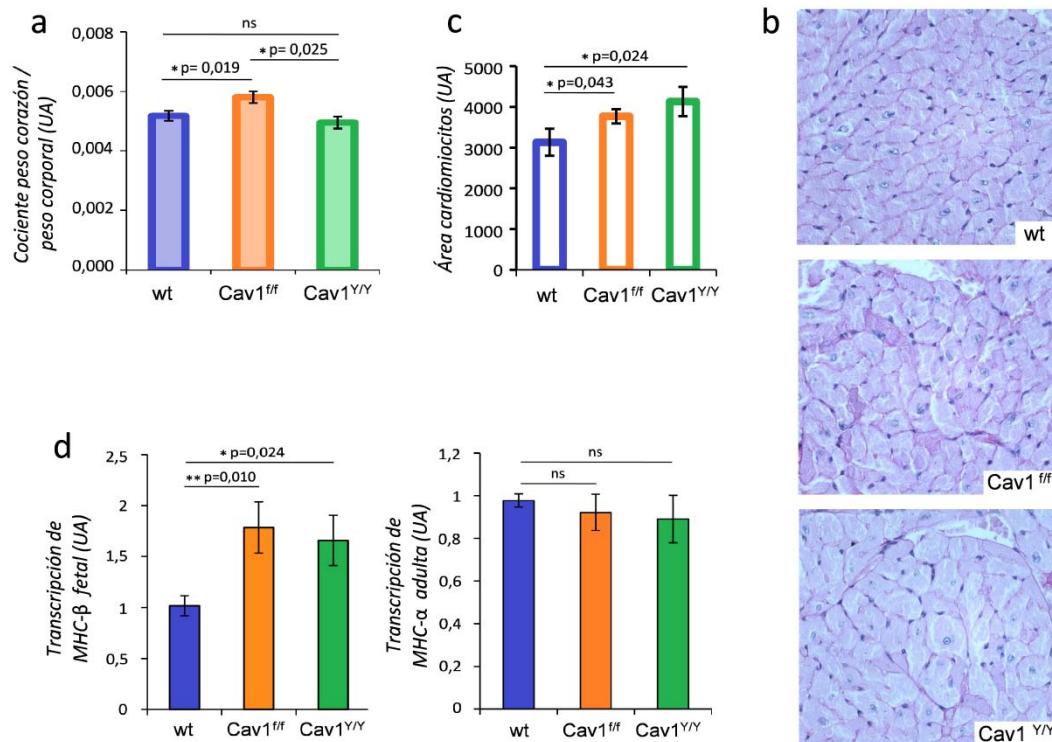


Figura R30. Los cardiomiocitos de corazones $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{Y/Y}$ son hipertróficos. (a) Relación del peso del corazón respecto al peso corporal de ratones wt, $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{Y/Y}$ (entre 15 y 40 semanas de edad). Las barras representan medias \pm error estándar de las medias del total de animales analizados; wt: n=37; $Cav1^{ff}$: n=30; $Cav1^{Y/Y}$: n=10. (b) Micrografías de secciones de corazones wt, $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{Y/Y}$ teñidas para visualizar el límite de los cardiomiocitos (tinción PAS, 20x). (c) El área de los cardiomiocitos fue medida con el programa *ImageJ*. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de un total de 100 células analizadas por punto. (d) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de MHC-β fetal y MHC-α adulta en el ventrículo izquierdo de corazones wt, $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{Y/Y}$. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de un total de 3 experimentos.

En primer lugar, se observó un incremento en el cociente peso del corazón / peso corporal en ratones Cav1^{ff} respecto a los wt, (figura R30a), lo que concuerda con lo previamente descrito⁽³²⁾, si bien el peso total del animal no se ve afectado (datos no mostrados). Esto se vio acompañado de una hipertrofia de los cardiomiocitos, observada en secciones histológicas de corazones Cav1^{ff}, comparados con los wt (figura R30b,c). Este aumento de tamaño de las fibras cardíacas también se observa en corazones Cav1^{Y/Y} (figura R30b,c), a pesar de que en estos ratones no hay una variación aparente del peso del corazón respecto al peso corporal, comparado con los wt (figura R30a). Esto indica que, en el caso de los ratones Cav1^{Y/Y}, un incremento en el tamaño de los cardiomiocitos no implica un aumento del tamaño de la masa relativa del corazón.

Se ha descrito que ciertas alteraciones cardíacas están asociadas a una regresión hacia el programa fetal de expresión génica en el ventrículo, incluyendo la expresión de la cadena pesada de la miosina fetal, MHC-β^(42, 171). Así, se ha encontrado un aumento en los niveles de ARNm de esta miosina fetal tanto en los ventrículos de ratones Cav1^{ff} como de Cav1^{Y/Y} (figura R30d), mientras que no se han observado cambios en la transcripción de la cadena pesada de la miosina del adulto (MHC-α) (figura R30d). Estos datos correlacionan con la hipertrofia de los cardiomiocitos observada en ambos genotipos respecto al wt.

Posteriormente, se analizó la función cardíaca de ratones wt, Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y} mediante ecocardiografía transtorácica. Se observó que en los ratones Cav1^{ff} las fracciones de eyección (FE, % del volumen expulsado del VI en cada sístole) y de acortamiento (FA, % de acortamiento del diámetro sistólico del VI, respecto a la diástole) están marcadamente reducidas (figura R31a), lo que indica una clara disfunción sistólica. Esta alteración se puede observar desde las 15 semanas (ratones más jóvenes analizados) y se mantiene hasta al menos las 40 semanas de edad. Sin embargo, en ratones que expresan Cav^{Y14F} tanto la FE como la FA vuelven a presentar unos valores similares a los del wt (figura R31a), indicando que la expresión de la proteína mutante es capaz de recuperar la función sistólica respecto a los ratones Cav1^{ff}.

Además, se observó que el grosor del septo interventricular (SIV) está reducido en ratones Cav1^{ff} (figura R31b, panel superior izquierdo); la misma tendencia se observa en el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (PPVI) (figura R31b, panel inferior izquierdo). Este adelgazamiento de las paredes ventriculares va acompañado de un ligero aumento de la cavidad diastólica del ventrículo izquierdo, reflejada en su diámetro interno (dDIVI) (figura R31b, panel superior derecho) y su volumen diastólico (Vol d) (figura R31b, panel inferior izquierdo). Todos estos cambios morfométricos son indicativos de una dilatación en el ventrículo izquierdo de estos animales con el consiguiente aumento de la masa cardíaca (figura R30a) y la disminución

del espesor de las paredes, lo que concuerda con las observaciones previamente realizadas por Zhao y colaboradores⁽³²⁵⁾.

Sin embargo, al comparar la morfometría del corazón de ratones $Cav1^{Y/Y}$ con los $Cav1^{f/f}$, se observó un claro incremento del grosor de las paredes, tanto del SIV como de la PPVI, así como una disminución del volumen y DIVI diastólico del ventrículo izquierdo (figura R31b), lo que indica una restauración del fenotipo, semejante al wt.

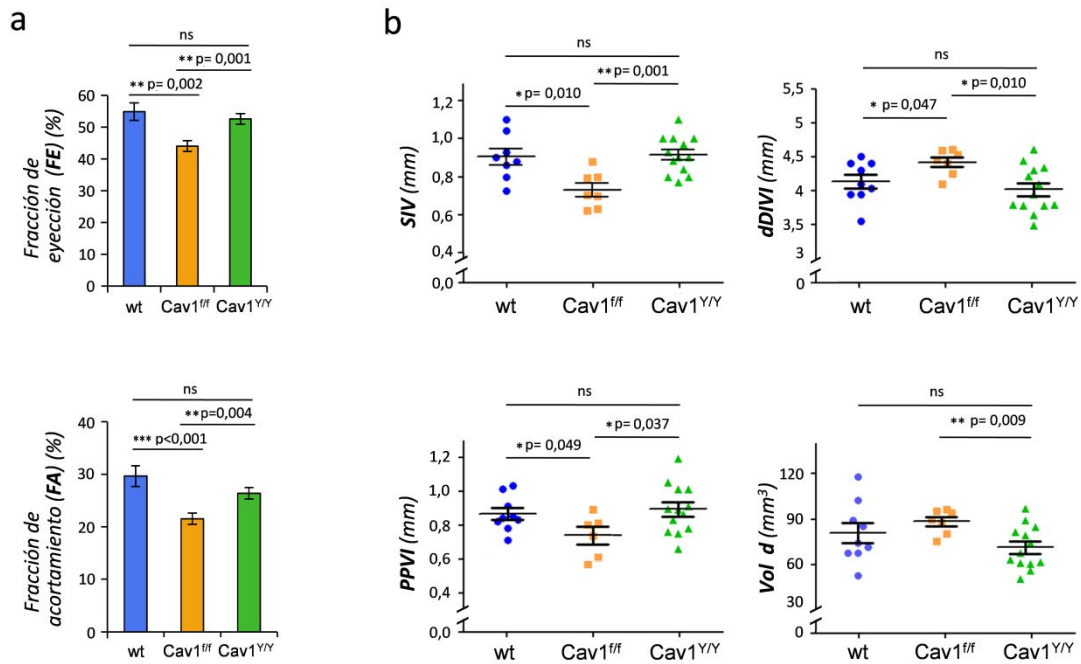


Figura R31. Los corazones $Cav1^{f/f}$ pero no los $Cav1^{Y/Y}$, presentan disfunción sistólica y el ventrículo izquierdo dilatado. (a) Medición de la función sistólica de ratones wt, $Cav1^{f/f}$ y $Cav1^{Y/Y}$, mediante ecocardiografía transtorácica. Se representan los porcentajes de la fracción de eyección (FE) y de acortamiento (FA) de ratones entre 15 y 40 semanas. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias de un total de entre 15 y 20 animales por punto. (b) Medidas morfométricas de corazones wt, $Cav1^{f/f}$ y $Cav1^{Y/Y}$, realizadas por ecocardiografía en ratones de 30-40 semanas de edad. Se representan los grosores del septo interventricular (SIV) y pared posterior del ventrículo izquierdo (PPVI), así como el diámetro interno del VI en diástole (dDIVI) y el volumen del VI en diástole (Vol d). Cada punto representa un animal. Las barras representan medias \pm error estándar de las medias del total de animales analizados.

Por tanto, mientras que en los ratones $Cav1^{f/f}$ se observa una disminución de la función sistólica y una dilatación del ventrículo izquierdo, semejante a lo que fue descrito previamente para ratones deficientes en $Cav1$ ^(32, 325), los ratones $Cav1^{Y/Y}$ presentan una función cardiaca aparentemente normal, a pesar de la hipertrofia encontrada en los cardiomiocitos de estos animales. Esto apunta a que tanto la ausencia de $Cav1$, como su no fosforilación en Y14 está afectando el corazón a nivel celular, pero que estos cambios están siendo compensados solo en los ratones que expresan $Cav1^{Y14F}$, mediante mecanismos dependientes de $Cav1$ pero no de su fosforilación.

4.3.3.3.- Los corazones $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{YY}$ presentan diferentes anomalías en la transmisión del impulso eléctrico cardíaco.

Para que la contracción cardíaca bombee la sangre hacia todos los tejidos del organismo es necesario que el corazón genere, de forma rítmica, impulsos eléctricos que son propagados de manera ordenada a través de todo el miocardio ⁽¹³⁵⁾. Los potenciales de acción cardíacos que producen la respuesta contráctil se originan en el nódulo sinoauricular, por unos miocitos especializados, para ser conducidos a través de las aurículas y fibras de conducción hasta los ventrículos, que responden contrayéndose de forma sincrónica ⁽²⁸⁷⁾. Además de los cardiomiocitos, se ha postulado que otras células cardíacas, como los fibroblastos, participan en la transmisión del impulso cardíaco ^(123, 135, 228).

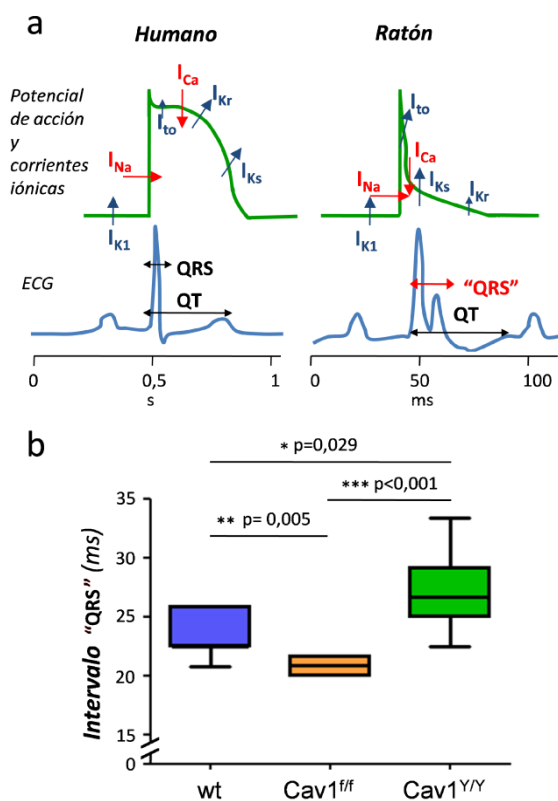


Figura R32: Los corazones $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{YY}$ presentan diferentes anomalías en la conducción del impulso eléctrico cardíaco.

(a) Esquema resumen de las principales diferencias electrofisiológicas entre el corazón humano y el de ratón. Se muestran los potenciales de acción, corrientes iónicas de polarización-despolarización y electrocardiograma de ambas especies. Nótese que en el caso del ratón, el intervalo "QRS" abarca la despolarización y una gran parte de la repolarización del potencial de acción, mientras que en humanos este intervalo es más corto, siendo el reflejo de la despolarización del potencial de acción. En rojo se muestran las corrientes iónicas de entrada de Na^+ y Ca^{2+} , y en azul las corrientes de salida de K^+ . ECG: electrocardiograma (adaptado de ⁽²³³⁾). (b) Ratones wt, $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{YY}$ de entre 30 y 40 semanas fueron analizados mediante electrocardiografía. Se representa la duración del intervalo "QRS", mediante diagramas de cajas, en el que se muestran la mediana (línea central), los cuartiles Q1 y Q3 (bordes de la caja), y los valores extremos (barras); n=8.

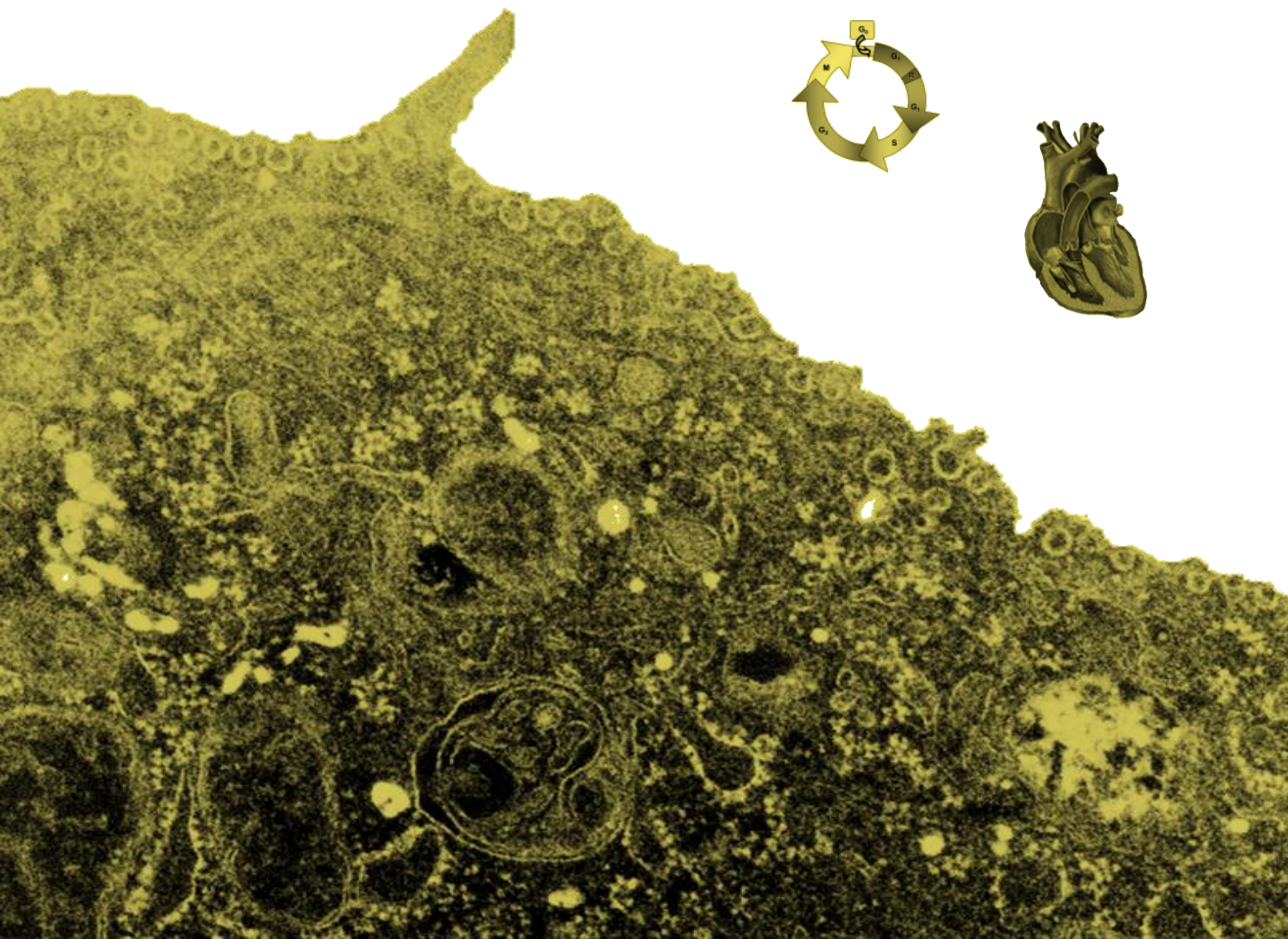
La generación y propagación del impulso eléctrico depende de la acción coordinada de múltiples canales iónicos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} ^(168, 260, 287). Se ha descrito que varios de estos canales iónicos están asociados a caveolas y caveolinas ⁽¹⁶³⁾. Además, se ha descrito que las caveolas regulan el transporte y localización en membrana de diversos canales de Ca^{2+} y Na^+ en cardiomiocitos ⁽¹²⁾. Por tanto se decidió estudiar si la ausencia de Cav1, o el defecto de su fosforilación en Y14 afectan a la propagación del impulso eléctrico cardíaco. Para ello se analizó, mediante electrocardiografía, el complejo "QRS" del electrocardiograma en ratones $Cav1^{ff}$ y $Cav1^{YY}$. La duración de este intervalo refleja la velocidad de conducción

intraventricular del impulso eléctrico cardíaco, así como la despolarización y repolarización temprana del potencial de acción en ratón⁽²³³⁾, y difiere del complejo QRS en humanos, como se muestra en la figura R32a.

Se observó un estrechamiento del intervalo “QRS” (es decir, una reducción de la duración de este intervalo) en ratones Cav1^{f/f} de entre 30 a 40 semanas, lo que sugiere una conductividad aumentada en los ventrículos deficientes en Cav1 (figura 32b). Esta alteración ha sido previamente asociada a defectos en canales iónicos que pueden llevar tanto a una aceleración del flujo de salida de K⁺ como a una disminución de la corriente de entrada de Ca²⁺^(233, 260). Por otra parte, se observó que ratones Cav1^{Y/Y} presentan un ensanchamiento del intervalo “QRS” (aumento de la duración de este intervalo), que es particularmente evidente a la edad de 30-40 semanas (figura R32b), y que puede ser el resultado de un impedimento del flujo de salida de K⁺, debido a la deficiencia de fosforilación de Cav1 en Y14.

Por consiguiente, tanto la ausencia de Cav1 como de su fosforilación en el residuo Y14 parecen afectar a la conducción del impulso eléctrico en el corazón, teniendo efectos diferentes en la modulación de este proceso. Estas diferencias se deben probablemente a una regulación diferencial, dependiente de Cav1 *per se* o de su fosforilación en Y14, de distintos canales iónicos asociados a caveolas, desencadenando una aceleración o un retraso en la conducción del impulso eléctrico, y por tanto de la contracción cardíaca.

5.- DISCUSIÓN



La proteína Cav1, además de ser clave en la formación de caveolas, participa en la transducción y modulación de diversas rutas de señalización, estando por tanto implicada en la regulación de multitud de procesos. En esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el estudio del papel de Cav1 en la regulación del ciclo celular, y más en detalle, en la proliferación dependiente de adhesión a matriz extracelular (MEC), mediada por integrinas. Mediante el uso de diversas líneas celulares deficientes en Cav1, se ha podido demostrar que Cav1 modula el arresto del ciclo celular en condiciones desfavorables, como son la falta de nutrientes o la pérdida de adhesión a sustrato. Esta regulación implica la activación de las vías de Rac y PI3K-Akt-GSK3 β , siendo independiente de Erk. Cav1 está regulando la internalización de microdominios de membrana específicos (CEMMs) donde se compartimentan moléculas clave de estas rutas de señalización, que son silenciadas tras la pérdida de adhesión por integrinas. Tanto la ausencia de Cav1 como la incapacidad de ser fosforilada en su residuo tirosina-14 (Y14) llevan a la desregulación de la internalización de CEMMs tras la pérdida de adhesión a sustrato, permaneciendo activas las rutas de Rac y PI3K-Akt, lo que permite la supervivencia y progresión del ciclo celular independientemente de adhesión por integrinas.

Además se ha generado y validado un nuevo modelo murino *Knock-in* Cav1^{Y/Y} que permite el estudio del papel de la fosforilación de Cav1 en Y14 en concreto, a un nivel fisiológico y sistémico. En este Tesis Doctoral se ha abordado la caracterización del fenotipo cardíaco de estos ratones.

5.1.- Cav1 en la regulación del ciclo celular.

Los resultados aquí presentados muestra que la deficiencia en Cav1, ya sea por delección del gen (líneas Cav1^{-/-}), por silenciamiento mediante ARNhc (preadipocitos 3T3L1-hcCav1) o por desregulación transcripcional oncogénica (células de melanoma humano M21L), promueve la proliferación celular, principalmente acompañado de una acumulación nuclear de ciclina D1 en ausencia de estímulos normalmente requeridos para la proliferación celular, como son factores de crecimiento y señalización por integrinas. Además de este fenotipo hiperproliferativo, los resultados muestran que la ausencia de Cav1 está cooperando en transformación tumoral con otros oncogenes como H-Ras en MEFs inmortales, e incluso se ha observado la cooperación con un único oncogen en MEFs primarios, si bien la potenciación es menor que cuando coopera con dos oncogenes (necesarios para la transformación en MEFs primarios^(142, 231)). Estos resultados concuerdan con el comportamiento como supresor tumoral ya descrito para Cav1, puesto que se ha visto que la ausencia de Cav1 coopera con otros oncogenes en transformación celular, como INK4a⁽³⁰⁸⁾, y contribuye al desarrollo de tumores en diferentes situaciones^(6, 28, 69, 304, 306). Además, este papel como supresor tumoral de Cav1 se ve avalado por el hecho de que la expresión de esta proteína está disminuída en numerosos tumores de origen humano⁽³⁰⁹⁾, así

como que al menos el 16% de los cánceres de mama portan mutaciones en el gen de *cav1* ^(108, 306), si bien esta última observación es controvertida ⁽²⁰⁴⁾.

En cuanto al mecanismo subyacente, en este trabajo se muestra que las células deficientes en *Cav1* presentan una acumulación de ciclina D1 nuclear tanto en cultivos asincrónicos como en ausencia de suero. Se ha descrito que el aumento transcripcional de ciclina D1 asociado a señalización por factores de crecimiento es dependiente de la ruta MAPK-Erk ^(166, 167), que además, parece contribuir al fenotipo tumorigénico en diversos modelos de deficiencia en *Cav1* ^(77, 239, 309). Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo muestran que la activación de la ruta de MAPK-Erk no es necesaria para la acumulación de ciclina D1 o para la hiperproliferación observadas en las células *Cav1*^{-/-}, fenotipos estos mediados por un aumento en la actividad de Rac. La activación de esta Rho-GTPasa regula la translocación de Erk al núcleo, independientemente de sus niveles de fosforilación ⁽¹¹⁴⁾; por tanto, el hecho de que la inhibición de Rac no afecte los niveles de fosforilación de Erk en los resultados presentados, no excluye la posibilidad de que Erk esté jugando un papel en la regulación del ciclo celular en ausencia de *Cav1*. Sin embargo, la inhibición específica de la fosforilación de Erk con el inhibidor farmacológico U0126 indica que la activación de Erk no es necesaria para la acumulación de ciclina D1 en células deficientes en *Cav1*.

Aparte del incremento en la expresión de ciclina D1 en células deficientes en *Cav1*, se ha observado una desregulación general en los niveles de los tres miembros de la familia de Retinoblastoma: pRb, p130 y p107. La función supresora de pRb sobre los factores activadores de la transcripción E2F-1, -2 y -3 está bien establecida: la unión de pRb a estos factores impide su unión a los promotores diana, inhibiendo la transcripción de los genes necesarios para la entrada del ciclo celular en fase S ^(257, 276). El complejo CDK4/6-ciclina D1 fosforila a pRb, permitiendo su disociación de los factores E2F, lo que posibilita la transcripción de genes tales como ciclina E y A y la consecuente progresión del ciclo celular ^(104, 162).

Sin embargo, los mecanismos de regulación ejercidos por p130 y p107 están menos explorados. Se ha descrito que estas dos proteínas se unen a factores de transcripción E2F-4 y -5, actuando los complejos resultantes como represores de la transcripción y cooperando con pRb en la represión transcripcional de genes fundamentales para la progresión celular ^(276, 302). Sin embargo, existen diferencias en los patrones de expresión de estas proteínas. Se ha descrito que en la fase G0 y G1 temprana los niveles del complejo p130-E2F son elevados, cooperando con pRb-E2F en su acción represora de la transcripción. Sin embargo, los niveles de p130 disminuyen en la fase G1 tardía, a medida que esta proteína va siendo hiperfosforilada. Esto deja accesibles los promotores antes reprimidos, y permite la unión de los factores E2F disociados de pRb, también hiperfosforilada en esta fase ^(31, 276). En cambio, p107 se va acumulando a medida que el ciclo celular progresa, lo que correlaciona con su

hiperfosforilación progresiva ^(16, 30, 131), aunque no está claro si esto puede ser el resultado de una estabilización de la proteína dependiente de fosforilación.

Los datos obtenidos no permiten determinar si los niveles relativamente bajos de pRb y p130, así como los elevados niveles de p107 encontrados en células deficientes en Cav1 son el resultado del aumento de los niveles de ciclina D1, lo que es sin duda objeto de interés para futuros estudios. Sin embargo, mientras que los cambios en los niveles totales de p130 y p107 encontrados en células Cav1 respecto a las wt podrían explicarse como una consecuencia de la hiperfosforilación de estas proteínas, la disminución de los niveles de pRb no puede entenderse de esta manera ya que, a diferencia de los otros miembros de la familia, se ha descrito que los niveles de pRb aparecen prácticamente constantes en células normales, siendo su estado de fosforilación lo que varía durante la progresión del ciclo celular ^(30, 276). Además, los resultados que aquí se muestran indican que los niveles de fosforilación de pRb en quiescencia, así como la tasa de fosforilación tras la adición de suero es similar en células wt y Cav1^{-/-}. Por tanto, se puede postular que los niveles disminuidos de pRb total en las células Cav1^{-/-} favorecen la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular, independientemente de su estado de fosforilación.

Por otra parte, en relación a la observación anterior, se ha comprobado que la eficiencia de entrada y salida de quiescencia es similar en células wt y deficientes en Cav1, dado que los niveles de fosforilación de pRb tras privación de suero son prácticamente indetectables en ambos genotipos, lo que refleja una inactivación del complejo CDK4/6-ciclina D1 ⁽²⁵⁸⁾ similar en ambas líneas celulares, a pesar de que los niveles de ciclina D1 se mantengan elevados en células Cav1^{-/-} privadas de suero. Esta similitud en la capacidad de entrada y salida de quiescencia se ve corroborada por el hecho de que, tanto en MEFs wt como Cav1^{-/-} arrestados en G0, la localización del factor de transcripción FoxO3a es nuclear, como corresponde a células privadas de suero ⁽¹⁶⁹⁾. Este factor de transcripción es translocado al citoplasma tras estimulación por adición de suero, siguiendo una cinética similar en ambas líneas celulares, indicando una eficacia semejante en la salida de quiescencia.

El hecho de que el arresto y salida de la fase G0 no estén alterados en células deficientes en Cav1 indica que la acumulación de ciclina D1 observada en esta fase no es capaz de aumentar la actividad de las quinasas CDK4/6. Esto podría ser debido a que los inhibidores de la familia INK ⁽²⁵⁸⁾ están siendo capaces de contrarrestar el exceso de ciclina D1 observado en células Cav1^{-/-} en G0, inhibiendo eficazmente la activación de CDK4/6 y previniendo la fosforilación temprana de pRb.

Sin embargo, a pesar de que no existen diferencias aparentes en la entrada y salida de quiescencia, las células deficientes en Cav1 progresan más rápido a través de la fase G1/S en respuesta a la adición de suero. Esto parece ser independiente de los niveles de otros inhibidores

claves en la regulación de la transición de la fase G1 a S, como p27^{KIP1}, cuyos niveles en quiescencia son elevados en ambos genotipos. Esto excluye la posibilidad de que el fenotipo de proliferación más rápida en células Cav1^{-/-} sea debido a una inducción insuficiente de estos inhibidores. Por el contrario, este hecho sugiere que el aumento de los niveles de ciclina D1 en células deficientes en Cav1 es suficiente para eludir el control de la actividad de CDK2-ciclina E, acortando la fase G1 y entrando antes en la fase S. Esto reforzaría la conexión entre el aumento de ciclina D1 y la progresión del ciclo celular acelerada en células deficientes en Cav1.

5.2.- Cav1 y el crecimiento dependiente de adhesión.

Además de un diferente comportamiento en la progresión del ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento, los resultados mostrados en el presente trabajo indican que la deficiencia de Cav1 permite la progresión del ciclo celular en ausencia de adhesión a matriz extracelular. Esto concuerda con evidencias de trabajos anteriores, que indican una implicación de Cav1 en la regulación del crecimiento dependiente de adhesión. Así, se ha descrito anteriormente que en células tumorales o en células NIH3T3 transformadas con oncogenes, tales como v-src, v-abl, Bcr-abl o Ras, la transformación correlaciona con una disminución en los niveles de ARNm y proteína de Cav1^(138, 304). Además, se ha descrito que la restauración de la expresión de Cav1 revierte el fenotipo de crecimiento independiente de adhesión en ciertos tumores^(62, 148, 324) y que el silenciamiento de Cav1 en células NIH3T3 confiere a las células la capacidad de crecimiento en agar blando⁽⁷⁷⁾. Sin embargo, el mecanismo por el que Cav1 puede estar regulando la progresión del ciclo celular dependiente de adhesión por integrinas no está bien establecido.

Los datos presentados en esta Tesis Doctoral confirman que la ausencia de Cav1 permite el crecimiento independiente de adhesión, siendo este hecho dependiente de la activación de Rac y la vía PI3K-Akt-GSK3 β , e independiente de la vía MAPK-Erk.

Se ha descrito que la actividad de Rac está elevada en células deficientes en Cav1^(49, 95). Esto se debe a un aumento de los niveles de Rac en la membrana plasmática de estas células⁽⁴⁹⁾, puesto que la activación de Rac mediada por integrinas se da a través de la regulación de su translocación a microdominios de membrana enriquecidos en colesterol (CEMMs), en lugar de mediante la modulación de su unión a GTP⁽⁵¹⁾. Por otra parte, se ha demostrado que la internalización de los dominios de membrana en los cuales se da la activación de Rac ocurre tras la pérdida de adhesión a MEC, por un mecanismo dependiente de la fosforilación de Cav1 en su residuo Y14⁽⁴⁹⁾. Estos hechos permiten postular que el mecanismo por el que Cav1 está regulando la progresión del ciclo celular mediada por integrinas depende de la internalización de estos CEMMs tras la pérdida de adhesión, lo que permitiría el silenciamiento de diversas

rutas de señalización implicadas en la progresión del ciclo celular y la supervivencia. Por tanto, la ausencia de Cav1 permite evadir el control ejercido por integrinas sobre estas rutas de señalización, conduciendo a un defecto en el bloqueo de vías promotoras de la proliferación e involucradas en supervivencia celular (figura D1).

Así, se ha comprobado en este trabajo que la ausencia de internalización de CEMMs es capaz de promover la proliferación en células wt no adheridas a sustrato, mimetizando el fenotipo encontrado en células Cav1^{-/-}. Además, este fenotipo es dependiente de la fosforilación de Cav1 en la posición Y14, que se ha descrito como necesaria para la internalización de CEMMs mediada por integrinas ⁽⁴⁹⁾, a pesar de que no afecte a la capacidad de formación de caveolas ⁽⁴⁹⁾. De hecho, estas estructuras parecen no ser necesarias en el control de la internalización de CEMMs, y por tanto, de la proliferación celular dependiente de adhesión ejercida por Cav1. Como se muestra en este trabajo, Cav1 es capaz de dirigir la internalización de CEMMs y el arresto del ciclo celular en ausencia de adhesión a MEC en células deficientes en PTRF, proteína imprescindible para la formación de caveolas ⁽¹¹³⁾. Esto ocurre a pesar de que los niveles de Cav1 están disminuidos en estas células, posiblemente por inestabilidad y degradación de la proteína en ausencia de PTRF ⁽¹¹³⁾, lo que reforzaría la idea de que determinados niveles de Cav1, y más concretamente, de su fosforilación, son suficientes para la internalización de CEMMs y el silenciamiento de rutas de señalización implicadas en control de la progresión del ciclo celular por integrinas.

En la presente Tesis Doctoral se ha comprobado que las células Cav1^{-/-} pierden su capacidad de crecimiento independiente de adhesión cuando se bloquea la activación de Rac, ya sea mediante el uso de un dominante negativo o con un ARN de interferencia; a la inversa, la translocación forzada de Rac a membrana plasmática es suficiente para permitir la proliferación celular independiente de adhesión en células wt. Estos resultados permiten concluir que el bloqueo de la activación de Rac por internalización de CEMMs mediada por Cav1 lleva al arresto del ciclo celular en ausencia de adhesión a MEC (figura D1).

Aparte de regular la activación de Rac, se ha descrito que la internalización de CEMMs mediada por Cav1 modula la activación de la ruta PI3K-Akt en ausencia de señalización por integrinas ⁽⁴⁹⁾. Los datos obtenidos indican que el crecimiento independiente de adhesión observado en células deficientes de Cav1 está también mediado por la hiperactivación de la ruta PI3K-Akt. Esta modulación se da por medio de la inhibición de GSK3 β (figura D1), como se observa mediante el uso del inhibidor químico LiCl, y por silenciamiento con un ARNi. Además, esta acción de PI3K-Akt a través de la inhibición de GSK3 β es específica, ya que no se ven alteradas otras vías clásicamente afectadas por PI3K-Akt, como mTORC-S6K. La inhibición de GSK3 β en células Cav1^{-/-} conduce a la acumulación de ciclina D1, ya que se ha descrito que GSK3 β actúa como un regulador negativo de la transcripción y estabilidad de esta

ciclina: por un lado, GSK3 β induce la degradación de β -catenina, afectando a la transcripción de ciclina D1⁽²⁸⁵⁾; por otro, modula la salida del núcleo de ciclina D1 mediante su fosforilación, lo que conduce a su degradación en el proteosoma^(55, 56). Estos hechos van en consonancia con la acumulación nuclear de ciclina D1 observada en células Cav1^{-/-}. Sin embargo, esta acumulación de ciclina D1 en núcleo no es permanente, ya que se observa que, durante la fase S, los niveles de esta ciclina disminuyen, indicando que tiene lugar su degradación en esta fase. Este hecho apunta a que, si bien la exportación nuclear es deficiente, no está totalmente bloqueada.

Por otro lado, se sabe que la ruta MAPK-Erk está implicada en la regulación del ciclo celular^(9, 166, 258). Asimismo, se ha descrito que está hiperactivada en diferentes sistemas en ausencia de Cav1, como por ejemplo tras su inhibición con oligonucleótidos antisentido⁽⁷⁷⁾ y en diversos modelos genéticos que conllevan la deficiencia en Cav1, tanto en el caso de *Caenorhabditis elegans*⁽²³⁹⁾ como en numerosos tejidos obtenidos de ratones Cav1^{-/-}^(144, 309). Además, se ha observado en trabajos previos que la hiperactivación de esta vía en células Cav1^{-/-} se da como consecuencia del defecto en la internalización de CEMMs en ausencia de adhesión por integrinas⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, en la presente Tesis Doctoral se muestra que esta ruta no está implicada en el crecimiento independiente de adhesión observado en ausencia de Cav1. Esta desconexión puede deberse a que los niveles de Rho-GTP están disminuídos en células Cav1^{-/-}⁽⁹⁵⁾. Se ha descrito que Rho controla la correcta expresión de ciclina D1 en la fase G1 media-tardía, a través de la activación sostenida de Erk⁽³⁰³⁾, así como reprimiendo su expresión prematura, contrarrestando la inducción mediada por Rac⁽³⁰³⁾ (figura D1). La disminución de los niveles de Rho activo observada en ausencia de Cav1⁽⁹⁵⁾ podría estar desacoplando la ruta de Erk de la regulación del ciclo celular, haciendo que la hiperactivación de esta vía no tenga efecto en términos de proliferación celular en ausencia de Cav1.

Asimismo, los bajos niveles de activación de Rho no son capaces de reprimir la expresión de ciclina D1 en quiescencia y fase G1 temprana debida a la hiperactivación de Rac en células Cav1^{-/-}. Esto se revierte al restaurar la activación de Rho con un mutante constitutivamente activo, RhoV14. Por tanto, los efectos antagónicos de Rac y Rho en la regulación del ciclo celular se ven descompensados en ausencia de Cav1, donde Rac está hiperactivado debido al incremento de su translocación a membrana, y los niveles de Rho-GTP están disminuídos, llevando a la expresión prematura de ciclina de D1 por un mecanismo independiente de Erk, y contribuyendo a la hiperproliferación y al crecimiento independiente de adhesión observado en estas células (figura D1).

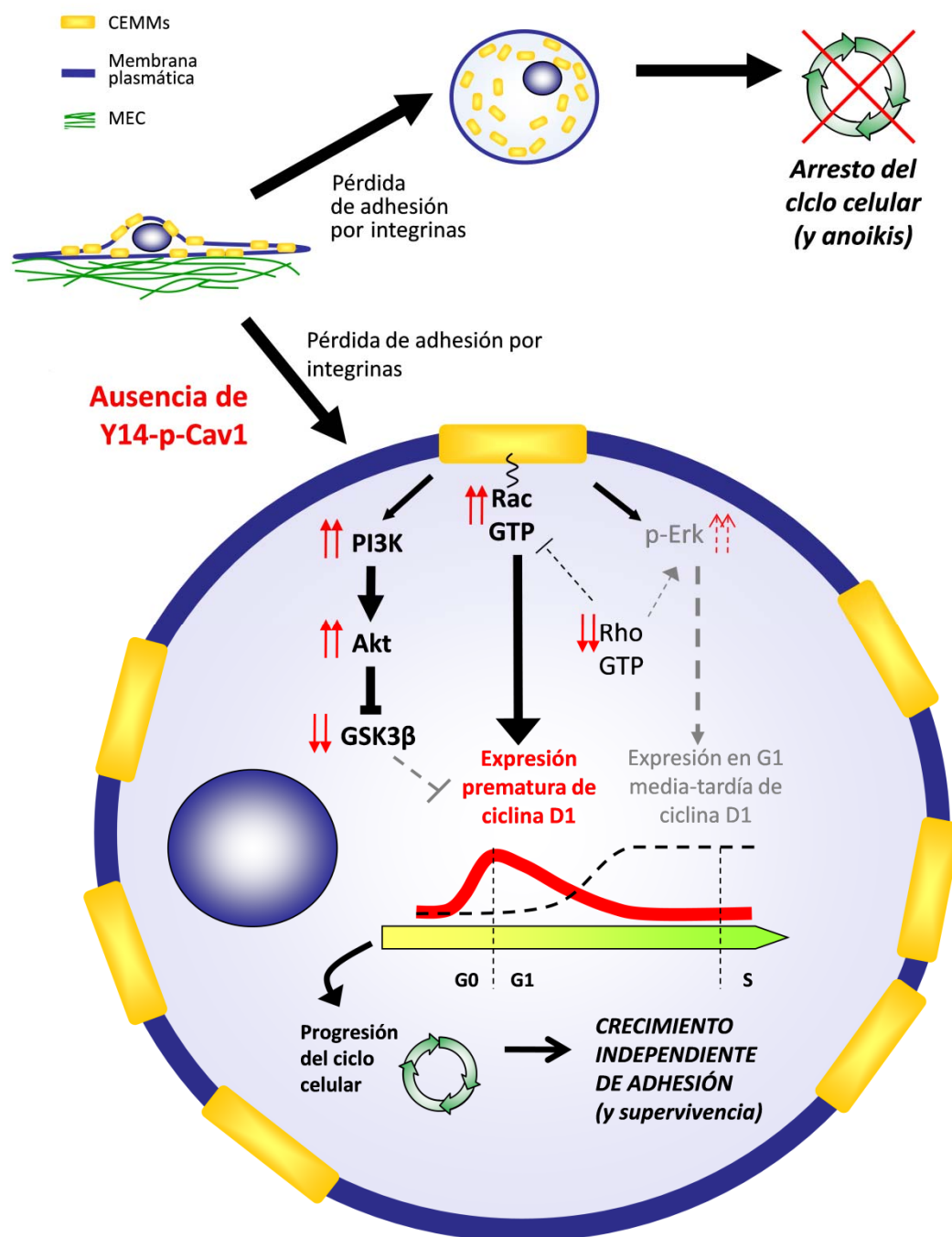


Figura D1: Modelo propuesto por el que Cav1 regula la supervivencia y progresión celular dependiente de integrinas. Cuando la célula pierde su adhesión a matriz extracelular, Y14-p-Cav1 media la internalización de CEMMs, lo que conduce al silenciamiento de diversas rutas de señalización implicadas en el control de la progresión del ciclo celular y la supervivencia, provocando el arresto del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis. En ausencia de Y14-p-Cav1, la internalización de CEMMs se ve afectada, de modo que las cascadas de señalización de Rac, PI3K-Akt y Erk permanecen activadas tras la pérdida de adhesión a sustrato, llevando a la proliferación y supervivencia celular en ausencia de adhesión a MEC. Por otra parte, la ausencia de Cav1 disminuye la activación de Rho, que es necesaria para los efectos de Erk sobre la expresión de ciclina D1 y para antagonizar los efectos de Rac en la inducción temprana de ciclina D1. Como resultado, aparece una expresión prematura de ciclina D1, permitiendo la progresión del ciclo celular en ausencia de adhesión por integrinas. Por tanto, el control del crecimiento dependiente de anclaje se da por la inactivación de señales dependientes de integrinas tras la internalización de CEMMs, proceso mediado por Cav1, y más concretamente, dependiente de su fosforilación en Y14.

5.3.- Cav1 y anoikis.

En este trabajo se muestra que la ausencia de Cav1, además de conferir la capacidad de crecimiento independiente de adhesión, permite a las células eludir el proceso de *anoikis*. Los mecanismos por los que Cav1 regula el control de la supervivencia mediada por integrinas no están bien definidos. Sin embargo, en el presente trabajo se muestra que células deficientes en Cav1 presentan una hiperactivación en ausencia de adhesión a sustrato de rutas claves para la supervivencia celular, como son las rutas de Rac y PI3k-Akt ^(40, 74, 297). En concreto, se ha descrito que esta última juega un papel importante como promotora de la supervivencia celular, puesto que inhibe diversas proteínas pro-apoptóticas como Bad y caspasa-9, así como factores de transcripción *forkhead* y GSK3 β ^(40, 297) que, como se ha visto, está inhibida en ausencia de Cav1.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten postular que la resistencia a *anoikis* observada en ausencia de Cav1 ocurre mediante un mecanismo similar al que regula el crecimiento independiente de adhesión, esto es, mediante la desregulación de la internalización de CEMMs en ausencia de señalización por integrinas, lo que conduce a la activación de rutas potencialmente implicadas en supervivencia celular, como son las vías de Rac y PI3K-Akt. La implicación directa de la hiperactivación de estas rutas de señalización en el fenotipo de resistencia a *anoikis* observada en células Cav1^{-/-} está siendo analizada actualmente en el laboratorio.

Los resultados aquí presentados refuerzan el papel previamente descrito para Cav1 como un supresor tumoral, aportando un mecanismo por el que regula la supervivencia y proliferación celular dependiente de integrinas, que aparece alterado en aquellas células tumorales que han perdido la expresión y/o función de Cav1.

Sin embargo, también se ha descrito que Cav1 puede actuar como un promotor tumoral en determinados tejidos y tumores, como ocurre en ciertos carcinomas de próstata ^(150, 189, 280, 286), en carcinomas de vejiga ⁽²¹⁴⁾, de células escamosas esofágicas ⁽¹³⁰⁾, y de células no- pequeñas de pulmón (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) ⁽²⁷⁷⁾. Estos tumores son altamente agresivos, en los que la expresión de Cav1 está elevada ⁽²⁵⁵⁾.

Estos efectos contrapuestos de Cav1 en la tumorigénesis permiten postular que los niveles de Cav1 deben modificarse durante la progresión tumoral. Así se requerirían bajos niveles de Cav1 en estadios tempranos del desarrollo del tumor para adquirir la capacidad de supervivencia y crecimiento independiente de adhesión, en ausencia de señalización por integrinas. Esto correlaciona con el hecho de que la expresión de Cav1 aparece disminuida en la mayoría de tumores primarios ⁽²⁵⁵⁾. En estadios posteriores, la expresión de Cav1 tiende a ser elevada, como

ocurre en el caso de tumores más agresivos e invasivos ⁽²⁵⁵⁾. En estos tumores, parece ser que la expresión de Cav1 está elevada principalmente en las células del estroma ⁽⁹¹⁾, lo que favorecería la migración de las células tumorales, incrementando la invasividad y el potencial metastásico del tumor.

Esta hipótesis pone de manifiesto la complejidad funcional de Cav1, en este caso mediante la supuesta modificación de sus patrones de expresión o activación durante el desarrollo de un proceso como la tumorigénesis. Los nuevos modelos murinos generados en este trabajo permitirán dilucidar estas cuestiones *in vivo* en un futuro próximo.

5.4.- Ratones Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y}.

Además, la complejidad funcional de Cav1 también está relacionada con su complejidad estructural. De hecho, se han descrito múltiples funciones de esta proteína asociadas a su dominio de anclaje (CSD, *caveolin scaffolding domain*), tales como su capacidad de unión a colesterol y la regulación ejercida sobre diversas moléculas de señalización ^(64, 218). Asimismo, diversas funciones de esta proteína han sido asociadas a modificaciones postraduccionales específicas, como es el caso de la fosforilación en el residuo Y14. En concreto, se ha descrito que esta fosforilación está implicada en la internalización de CEMMs tras pérdida de adhesión a MEC ⁽⁴⁹⁾, en procesos de migración direccional ⁽⁹⁵⁾, en la dinámica de adhesiones focales ^(82, 95, 186), en mecanotransducción ⁽²¹¹⁾, en el remodelado de la matriz extracelular ⁽⁹¹⁾ y en la regulación del crecimiento dependiente de integrinas, como se ha mostrado en el presente trabajo. En esta Tesis Doctoral se describe la generación de un ratón *Knock-in* que expresa Cav1^{Y14F}, en el que se ha sustituido la tirosina en posición 14 por fenilalanina, de manera que se impide la fosforilación de Cav1 en este residuo. Este nuevo modelo murino, que resultó ser viable y sin alteraciones en la fertilidad, representa una herramienta valiosa para el estudio, a nivel fisiológico y sistémico, de la implicación de esta modificación postraducciona en concreto en los diversos fenotipos y alteraciones en los que Cav1 es relevante.

Se ha generado también, como un paso intermedio en la estrategia de generación del ratón *Knock-in*, un nuevo modelo murino que no expresa Cav1 (Cav1^{f/f}), como una alternativa a los modelos Cav1^{-/-} previamente generados en otros laboratorios ^(58, 217, 325) y que, como los previamente descritos, es viable y fértil. En el presente trabajo se ha escindido de manera ubicua la caja PGK-neo-stop mediante el cruce de ratones Cav1^{f/f} con ratones que expresan Sox2Cre recombinasa, de manera que se da la expresión de Cav1^{Y14F} en todos los tejidos del ratón. Esto permite estudiar el efecto de la ausencia de fosforilación en Y14 de manera general en el organismo. Sin embargo, la estrategia diseñada permitirá cruzar ratones Cav1^{f/f} con ratones que expresen Cre recombinasas específicas de tejido o tipo celular, de manera que los ratones resultantes sólo expresarían Cav1^{Y14F} en el tejido de elección, siendo la expresión de Cav1 nula

en el resto del organismo. Esto resulta de gran interés para estudios futuros, en los que se podrá discernir si determinado efecto de la ausencia de fosforilación de Cav1 en Y14 es específico de tejido o tipo celular.

En este trabajo se ha procedido a la validación de los nuevos modelos murinos generados. Así, se ha analizado la expresión de caveolinas en MEFs primarios derivados de estos ratones y se ha comprobado que, en el caso de los Cav1^{ff}, la expresión de Cav1 está bloqueada, y la de Cav2 aparece disminuida, ya que la estabilidad de Cav2 depende de Cav1⁽²⁰¹⁾. En el caso de los ratones Cav1^{Y/Y}, los niveles de Cav1^{Y14F} son similares a los de Cav1 en los wt, indicando que la mutación introducida no afecta aparentemente a la expresión ni estabilidad de la proteína. Además, los niveles de Cav2 tampoco parecen verse afectados por la ausencia de fosforilación de Cav1 en Y14. Se ha comprobado en MEFs primarios que la introducción de la mutación Y14F efectivamente impide la fosforilación de Cav1, indicando que si bien esta mutación no afecta a los niveles de expresión de esta caveolina, sí impide que sea fosforilada, confirmándose la validez del sistema.

Por otra parte, se ha observado que células que expresan endógenamente Cav1^{Y14F} reproducen los fenotipos previamente descritos en sistemas *in vitro* de expresión exógena de esta proteína mutada. Así, los resultados presentados muestran que la ausencia de fosforilación de Cav1 en Y14 conduce a un fenotipo hiperproliferativo, lo que correlaciona con un retraso en la internalización de CEMMs, que concuerda con lo previamente descrito⁽⁴⁹⁾.

5.5.- Fenotipo cardíaco de los ratones Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y}.

Tras la validación del sistema, se realizó una caracterización preliminar del fenotipo cardíaco de estos ratones, dado que ya había sido descrito que los ratones Cav1^{-/-} previamente generados mostraban fenotipos cardiovasculares anómalos^(32, 315, 325). En este trabajo se ha mostrado que tanto los ratones que no expresan Cav1 (Cav1^{ff}), como los que expresan la Cav1 mutante (Cav1^{Y/Y}) presentan cardiomiocitos hipertróficos, correlacionando con una regresión hacia el programa fetal de expresión génica (observado por un aumento en la transcripción de MHC-β), característica en cardiomiopatías^(42, 171). Sin embargo, estas alteraciones a nivel celular sólo tienen consecuencias funcionales en los Cav1^{ff}, que presentan una disfunción sistólica y una cardiomiopatía dilatada similar a la descrita previamente en ratones Cav1^{-/-}⁽³²⁵⁾. Así, se observa que las fracciones de eyección y de acortamiento están disminuidas en ratones Cav1^{ff}, indicando un defecto en la capacidad de contracción del corazón. Esto correlaciona con el hecho de que el diámetro y volumen del ventrículo izquierdo están aumentados, con el consiguiente aumento de masa cardíaca y disminución del espesor de las paredes de esta cámara, indicativo de una cardiomiopatía con dilatación ventricular similar a la descrita por Zhao y colaboradores en ratones deficientes en Cav1⁽³²⁵⁾.

Sin embargo, los ratones Cav1^{Y/Y} no presentan alteraciones funcionales ni morfométricas en sus corazones, a pesar de que sus cardiomiocitos son hipertróficos. Esto permite postular que, tanto la ausencia de Cav1 como la ausencia de fosforilación en Y14 llevan a una hipertrofia de los cardiomiocitos, posiblemente mediante mecanismos dependientes de la fosforilación de Cav1 en Y14. Esta hipertrofia conduce a alteraciones cardíacas en el caso de los Cav1^{f/f}, como son la disfunción sistólica y la dilatación ventricular que presentan estos ratones. No obstante, esta alteración en los cardiomiocitos es “asintomática” en el caso de los Cav1^{Y/Y}, ya que en estos ratones no se observa alteración cardíaca funcional ni morfométrica aparente, posiblemente debido a mecanismos compensatorios independientes de la fosforilación en Y14 y potencialmente dependientes de otros dominios o características estructurales de Cav1.

El desarrollo de una cardiomiopatía depende de múltiples factores, ya sea a nivel local (hipertrofia de los cardiomiocitos, fibrosis intersticial, hiperplasia de fibroblastos) o a nivel sistémico (aumento de la presión arterial, activación del sistema renina-angiotensina II-aldosterona, etc.)^(106, 111, 112). La combinación de estos factores puede dar lugar a la aparición de alteraciones cardíacas funcionales y morfométricas, lo que permite pensar que, también, determinados factores pueden llegar a compensar el efecto de otros sobre el desarrollo de una cardiomiopatía. Así, se ha observado que los ratones Cav1^{Y/Y} presentan un descenso de la presión arterial respecto a los wt y Cav1^{f/f} (datos no mostrados), lo que puede estar evitando una sobrecarga cardíaca, y compensando el efecto de la hipertrofia de los cardiomiocitos sobre las funciones y tamaño del corazón. El estudio de los mecanismos, tanto a nivel sistémico como molecular, que están actuando para compensar los efectos de la hipertrofia observada en cardiomiocitos de corazones Cav1^{Y/Y}, así como la causa de esta hipertrofia en ambos genotipos está siendo actualmente abordado en el laboratorio.

Se ha descrito en ratones Cav1^{-/-} que las cardiomiopatías observadas pueden ser debidas a hiperactivación de la vía p42/44 MAPK⁽³²⁾, así como a la hiperactivación de eNOS e hiperproducción de NO, que tiene efectos deletéreos en el corazón, induciendo estrés nitrosativo y causando daño tisular y efectos en el remodelado vascular^(182, 315, 316, 325). Por tanto, el análisis de la implicación de estas rutas de señalización en el fenotipo cardíaco observado en ratones Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y} resulta de gran interés para estudios futuros. Por otra parte, se ha descrito que la angiotensina II puede causar hipertrofia de los cardiomiocitos, ya sea mediante un mecanismo directo^(111, 247) o secundario, mediante la estimulación de la secreción de factores paracrinos por parte de los fibroblastos^(18, 97, 207). Se ha descrito que los ratones Cav1^{-/-} presentan niveles elevados de AngII en sangre⁽¹⁴⁰⁾, y que la administración de un fármaco bloqueante del receptor AT1 de AngII (telmisartan) revierte las deficiencias cardíacas observadas en estos animales⁽¹⁴⁰⁾. Además, trabajos previos han descrito que Cav1 interacciona y regula la activación del receptor AT1 tras su unión a AngII,^(121, 317) y que la estimulación con AngII aumenta la fosforilación de

Cav1 en su residuo Y14 ⁽²²⁵⁾. Todas estas evidencias apuntan a una posible implicación de la AngII en la hipertrofia de los cardiomiocitos encontrada tanto en ratones Cav1^{f/f} como Cav1^{Y/Y}, que está siendo estudiada actualmente en el laboratorio.

Por otra parte, se ha observado que los corazones Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y} presentan alteraciones en la conducción del impulso eléctrico, pero en sentidos opuestos. Mientras que la ausencia de Cav1 parece acortar el tiempo de repolarización del potencial de acción, la ausencia de fosforilación en Y14 retrasa la transmisión del impulso eléctrico. El potencial de acción implicado en la transmisión del impulso eléctrico depende de la activación de diversos canales iónicos, que han de actuar coordinadamente. Así, la generación del potencial depende de la apertura de canales de Na⁺ dependientes de voltaje, mientras que la repolarización depende del cierre de estos canales y de la entrada de Ca²⁺ y salida de K⁺, canales que son activados en diferentes fases para una correcta regulación de la transmisión del impulso eléctrico ^(135, 287).

Aunque los canales iónicos en humano y ratón están altamente conservados, se observan diferencias electrofisiológicas entre ambas especies ^(161, 185). El corazón murino late 10 veces más rápido, y por tanto los tiempos de duración del potencial de acción han de ser más cortos, y las corrientes de K⁺ de repolarización diferentes ⁽²³³⁾. No obstante, las alteraciones encontradas en ratones Cav1^{f/f} se asemejan al síndrome del QT corto en humanos, asociado a defectos en canales iónicos que aceleran la salida de K⁺ o disminuyen el flujo de entrada de Ca²⁺ ⁽³⁸⁾. Esta patología en humanos va acompañada de arritmias y síndrome de muerte súbita, pero estas alteraciones no se han observado en ratones Cav1^{f/f} posiblemente debido a las diferencias electrofisiológicas del corazón murino ⁽²³³⁾. En el caso de los ratones Cav1^{Y/Y}, el aumento de la duración del intervalo “QRS” observado recuerda al síndrome del QT largo descrito en humanos. Este síndrome agrupa varias patologías, asociadas a alteraciones en diferentes canales de K⁺ ⁽²⁶⁰⁾, que retrasan la repolarización del potencial de acción cardíaco.

Se ha descrito que varios de los canales iónicos implicados en la propagación del potencial de acción están asociados a caveolas y caveolinas ^(12, 163). Dado que la ausencia de Cav1 y la ausencia de su fosforilación en Y14 tienen distintas consecuencias sobre la transmisión del impulso cardíaco, se puede postular que existe una regulación diferencial de diferentes canales iónicos implicados en este proceso. Esta regulación puede darse a diferentes niveles, y puede ser diferente para cada tipo de canal. Así, en determinados casos son necesarias las caveolas para la correcta localización del canal iónico en la membrana plasmática, o para su endocitosis, y en otros casos puede darse una interacción directa de la Cav1 con el canal, que puede requerir la fosforilación en Y14 para la correcta activación de éste. Por tanto, esto permite pensar que esta potencial regulación diferencial de diversos canales iónicos, dependiente de Cav1 o de su fosforilación en Y14, podría explicar las diferencias encontradas en ratones Cav1^{f/f} y Cav1^{Y/Y} en

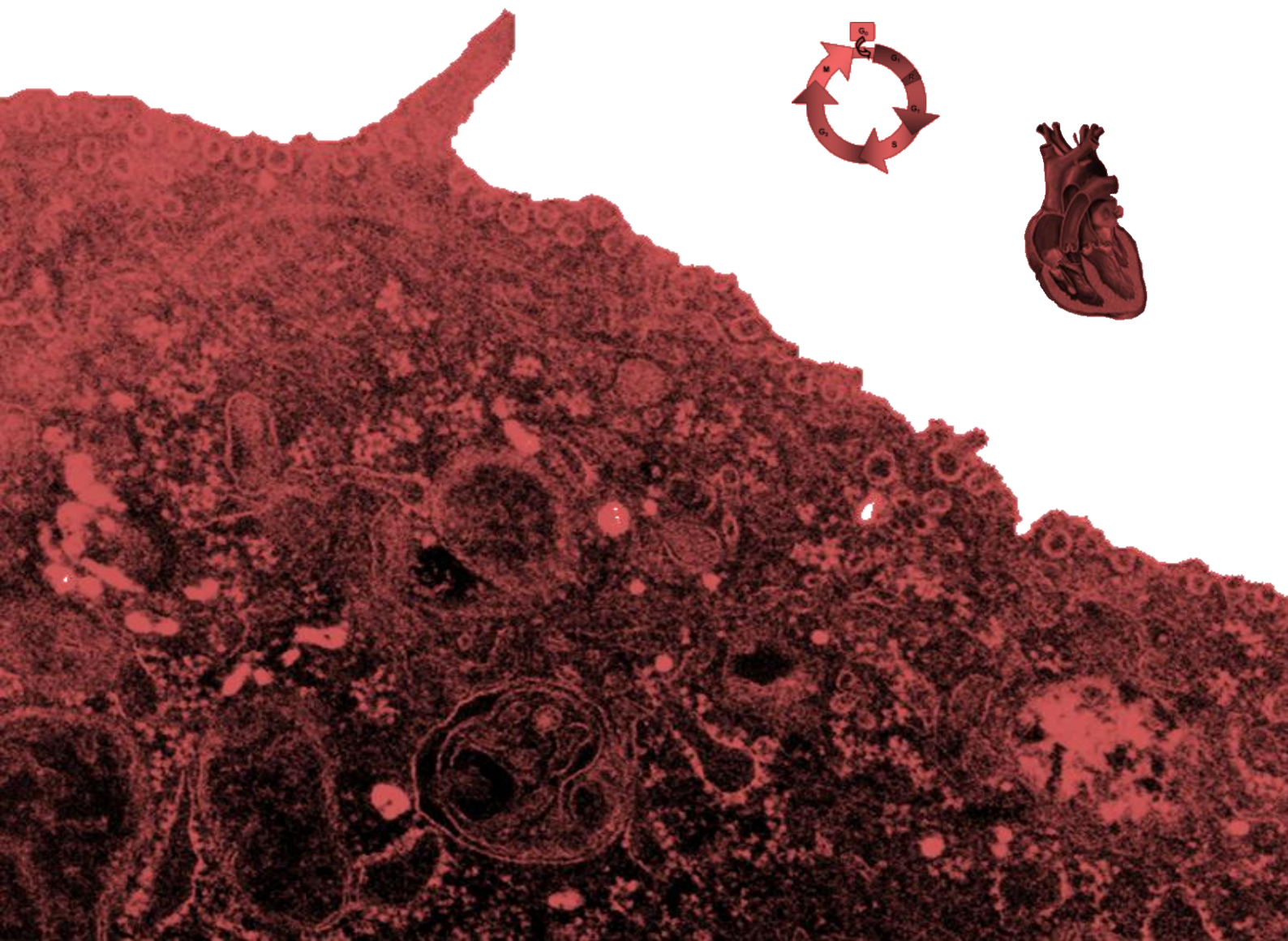
términos de conductividad del impulso eléctrico cardíaco. La identificación de los canales afectados en cada caso representa materia de análisis para estudios futuros.

Tradicionalmente se ha descrito que las alteraciones cardíacas encontradas en ratones Cav1^{-/-} se deben a la deficiencia de la expresión de esta proteína en fibroblastos y tejido vascular en el corazón, puesto que originalmente se describió que la caveolina que se expresa en cardiomiocitos es Cav3. Sin embargo, recientemente han aparecido diversos estudios que muestran la expresión de Cav1 en cardiomiocitos, tanto por técnicas de *Western-blot* y medición de niveles de ARNm en cardiomiocitos en cultivo ^(110, 205) como por inmunofluorescencia indirecta en secciones de corazón murino ^(43, 44) o por microscopía electrónica en muestras de corazón humano ⁽²²⁷⁾. En este trabajo, por técnicas de inmunofluorescencia indirecta, se detecta expresión de Cav1 en cardiomiocitos, lo que correlaciona con lo anteriormente descrito por otros autores. Sin embargo, en este punto no se puede descartar que los fenotipos encontrados en los corazones Cav1^{ff} y Cav1^{Y/Y} sean debidos únicamente a la expresión de Cav1 en cardiomiocitos, ya que se ha descrito que los fibroblastos cardíacos ejercen una gran influencia sobre los cardiomiocitos circundantes ^(18, 97, 123, 135, 228, 322). Estudios futuros que permitan restringir la expresión de Cav1 y Cav1^{Y14F} a determinados tipos celulares ayudarán a esclarecer la relevancia de cada estirpe celular en el fenotipo cardíaco de estos ratones.

En este trabajo se pone de manifiesto que la proteína Cav1 está implicada en la regulación de múltiples procesos. Más específicamente, diferentes dominios de esta proteína ejercen una regulación diferencial sobre la transducción de diversas rutas de señalización. Así, en ciertos casos es necesaria la formación de caveolas para la compartimentalización de diferentes moléculas de señalización; otras veces Cav1, mediante su fosforilación en Y14, ejerce una regulación mediante la internalización de determinados dominios de membrana en los que se compartimentan y activan diferentes transductores de señales, apagando o permitiendo diversas rutas de señalización. En otros casos la regulación de determinada molécula ocurre por interacción directa con Cav1, y esta unión puede ser dependiente de diferentes dominios de la proteína, como su CSD (*caveolin scaffolding domain*) o su fosforilación en Y14, que puede regular la interacción con otras proteínas al ser un sitio de unión específica para adaptadores que contienen dominios SH2 (como en el caso de Csk y Grb7 ^(27, 146)), aunque no se puede descartar que esté induciendo cambios conformacionales que permitan la interacción con otros dominios de la proteína.

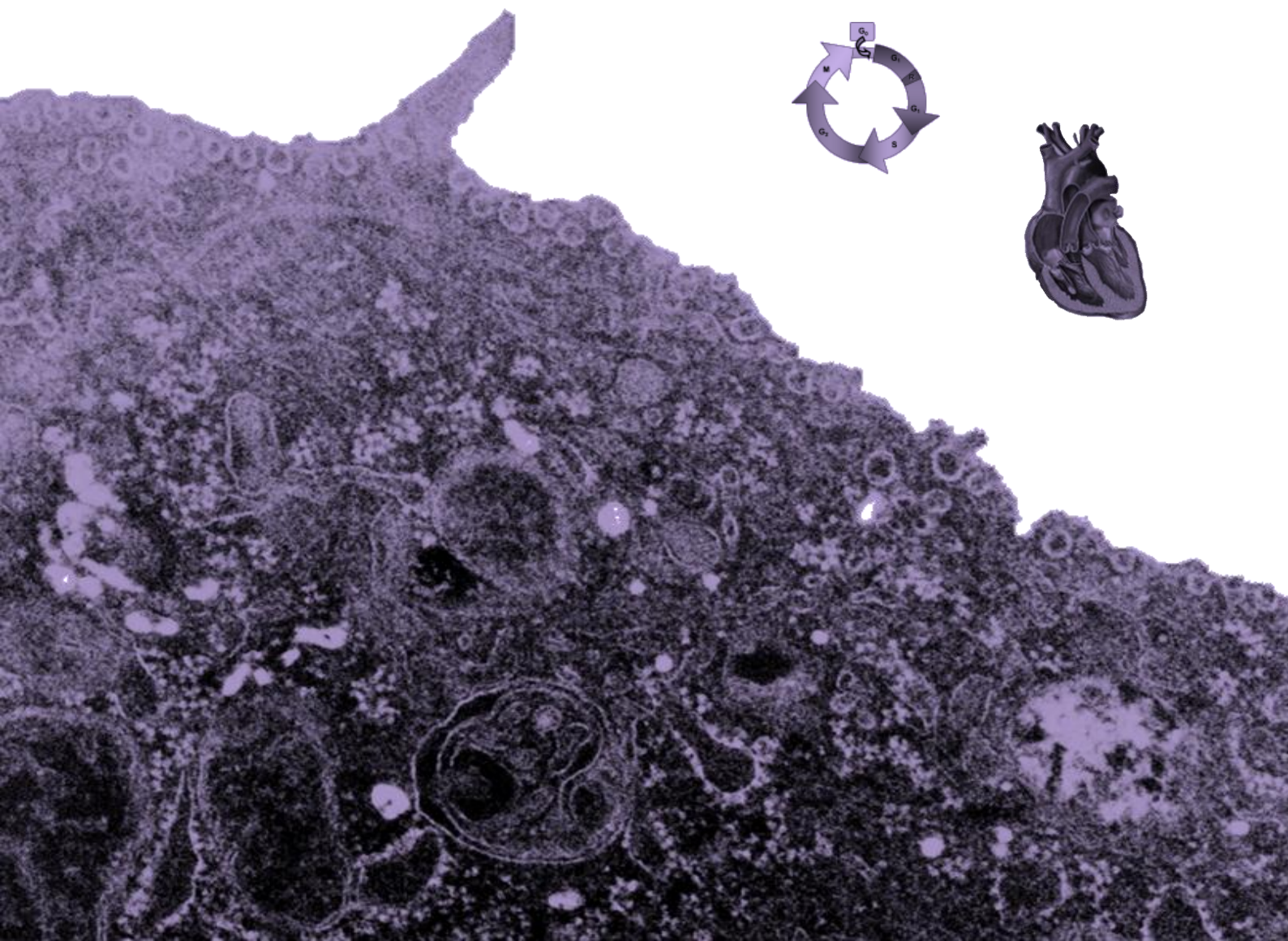
Por tanto la regulación ejercida por Cav1 sobre la transducción de señales y la regulación de diversos procesos es bastante compleja, y puede darse a diversos niveles. El nuevo modelo murino *Knock-in* Cav1^{Y/Y} generado supone una herramienta valiosa para profundizar en el estudio del papel de la fosforilación de Cav1 en Y14 en procesos regulados por Cav1.

6.- CONCLUSIONES



- 1.- Cav1 participa en la regulación de la proliferación celular, controlando la progresión a través de la fase G1 del ciclo, sin afectar la entrada ni la salida de quiescencia.
- 2.- La ausencia de Cav1 aumenta los niveles de ciclina D1, mediante la activación de la Rho-GTPasa Rac, en un mecanismo independiente de la fosforilación de Erk.
- 3.- Cav1 regula el crecimiento dependiente de adhesión por un mecanismo independiente de la activación de Erk, mediante la modulación de la actividad de las Rho-GTPasas Rac y Rho, y la modulación de la vía PI3K-Akt-GSK3 β .
- 4.- Cav1 regula los procesos de *anoikis* y de crecimiento dependiente de adhesión, mediando, en condiciones de pérdida de adhesión por integrinas, la internalización de microdominios de membrana (CEMMs) donde se compartimentan y activan diversas rutas de señalización implicadas en la progresión del ciclo celular y supervivencia.
- 5.- La internalización de CEMMs y la regulación del crecimiento dependiente de adhesión son dependientes de Cav1 y de su fosforilación en Y14, pero no de su papel en la formación de caveolas.
- 6.- Los nuevos modelos murinos generados representan una herramienta validada para el estudio a nivel fisiológico de la ausencia de Cav1 (Cav1^{f/f}) y la ausencia de su fosforilación en Y14 (Cav1^{Y/Y}).
- 7.- Tanto la ausencia de Cav1 como de su fosforilación en Y14 inducen un aumento del tamaño de los cardiomiocitos, que se acompaña de un aumento de expresión de MHC- β .
- 8.- Las alteraciones cardíacas observadas en modelos de ausencia de Cav1 (cardiomiopatía dilatada y disfunción sistólica) son compensadas por mecanismos dependientes de Cav1 pero independientes de su fosforilación en Y14.
- 9.- Tanto la ausencia de Cav1 como de su fosforilación en Y14 alteran la conducción del impulso eléctrico cardíaco, pero en sentidos opuestos, indicando una posible regulación diferencial de los diversos mecanismos implicados en este proceso.

7.- BIBLIOGRAFÍA



1. Aboulaich, N., U. Ortegren, A. V. Vener, and P. Stralfors. 2006. Association and insulin regulated translocation of hormone-sensitive lipase with PTRF. *Biochem Biophys Res Commun* 350:657-61.
2. Aboulaich, N., J. P. Vainonen, P. Stralfors, and A. V. Vener. 2004. Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J* 383:237-48.
3. Adams, P. D. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* 1471:M123-33.
4. Alberts, B. 2004. *Biología molecular de la célula*. Editorial Omega.
5. Albinsson, S., Y. Shakirova, A. Rippe, M. Baumgarten, B. I. Rosengren, C. Rippe, R. Hallmann, P. Hellstrand, B. Rippe, and K. Sward. 2007. Arterial remodeling and plasma volume expansion in caveolin-1-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1222-31.
6. Aldred, M. A., M. E. Ginn-Pease, C. D. Morrison, A. P. Popkie, O. Gimm, C. Hoang-Vu, U. Krause, H. Dralle, S. M. Jhiang, C. Plass, and C. Eng. 2003. Caveolin-1 and caveolin-2, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis. *Cancer Res* 63:2864-71.
7. Anderson, R. G. 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
8. Arthur, W. T., L. A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* 10:719-22.
9. Assoian, R. K., and E. A. Klein. 2008. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol* 18:347-52.
10. Assoian, R. K., and M. A. Schwartz. 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* 11:48-53.
11. Augustus, A. S., J. Buchanan, E. Gutman, G. Rengo, R. G. Pestell, P. Fortina, W. J. Koch, A. Bensadoun, E. D. Abel, and M. P. Lisanti. 2008. Hearts lacking caveolin-1 develop hypertrophy with normal cardiac substrate metabolism. *Cell Cycle* 7:2509-18.
12. Balijepalli, R. C., and T. J. Kamp. 2008. Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol* 98:149-60.
13. Bar-Sagi, D., and A. Hall. 2000. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103:227-38.
14. Bastiani, M., L. Liu, M. M. Hill, M. P. Jedrychowski, S. J. Nixon, H. P. Lo, D. Abankwa, R. Luetterforst, M. Fernandez-Rojo, M. R. Breen, S. P. Gygi, J. Vinten, P. J. Walser, K. N. North, J. F. Hancock, P. F. Pilch, and R. G. Parton. 2009. MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J Cell Biol* 185:1259-73.
15. Bauer, P. M., J. Yu, Y. Chen, R. Hickey, P. N. Bernatchez, R. Looft-Wilson, Y. Huang, F. Giordano, R. V. Stan, and W. C. Sessa. 2005. Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:204-9.
16. Beijersbergen, R. L., L. Carlee, R. M. Kerkhoven, and R. Bernards. 1995. Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev* 9:1340-53.
17. Bernatchez, P. N., P. M. Bauer, J. Yu, J. S. Prendergast, P. He, and W. C. Sessa. 2005. Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:761-6.

18. Booz, G. W., D. E. Dostal, and K. M. Baker. 1999. Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes: implications for the cardiac renin-angiotensin system. *Am J Cardiol* 83:44H-47H.
19. Bosch, M., M. Mari, A. Herms, A. Fernandez, A. Fajardo, A. Kassan, A. Giralt, A. Colell, D. Balgoma, E. Barbero, E. Gonzalez-Moreno, N. Matias, F. Tebar, J. Balsinde, M. Camps, C. Enrich, S. P. Gross, C. Garcia-Ruiz, E. Perez-Navarro, J. C. Fernandez-Checa, and A. Pol. 2011. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol* 21:681-6.
20. Briand, N., I. Dugail, and S. Le Lay. 2011. Cavin proteins: New players in the caveolae field. *Biochimie* 93:71-7.
21. Brown, D. A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221-4.
22. Brown, D. A., and E. London. 1997. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* 240:1-7.
23. Bu, J., S. R. Bruckner, T. Sengoku, J. W. Geddes, and S. Estus. 2003. Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 72:185-90.
24. Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167-79.
25. Byzova, T. V., C. K. Goldman, N. Pampori, K. A. Thomas, A. Bett, S. J. Shattil, and E. F. Plow. 2000. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* 6:851-60.
26. Cao, G., G. Yang, T. L. Timme, T. Saika, L. D. Truong, T. Satoh, A. Goltsov, S. H. Park, T. Men, N. Kusaka, W. Tian, C. Ren, H. Wang, D. Kadmon, W. W. Cai, A. C. Chinault, T. B. Boone, A. Bradley, and T. C. Thompson. 2003. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am J Pathol* 162:1241-8.
27. Cao, H., W. E. Courchesne, and C. C. Mastick. 2002. A phosphotyrosine-dependent protein interaction screen reveals a role for phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14: recruitment of C-terminal Src kinase. *J Biol Chem* 277:8771-4.
28. Capozza, F., T. M. Williams, W. Schubert, S. McClain, B. Bouzahzah, F. Sotgia, and M. P. Lisanti. 2003. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol* 162:2029-39.
29. Carver, L. A., and J. E. Schnitzer. 2003. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 3:571-81.
30. Classon, M., and N. Dyson. 2001. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 264:135-47.
31. Cobrinik, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24:2796-809.
32. Cohen, A. W., D. S. Park, S. E. Woodman, T. M. Williams, M. Chandra, J. Shirani, A. Pereira de Souza, R. N. Kitsis, R. G. Russell, L. M. Weiss, B. Tang, L. A. Jelicks, S. M. Factor, V. Shtutin, H. B. Tanowitz, and M. P. Lisanti. 2003. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C457-74.
33. Cohen, A. W., B. Razani, W. Schubert, T. M. Williams, X. B. Wang, P. Iyengar, D. L. Brasaemle, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2004. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53:1261-70.

34. Cohen, A. W., B. Razani, X. B. Wang, T. P. Combs, T. M. Williams, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2003. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C222-35.
35. Coleman, M. L., and C. J. Marshall. 2001. A family outing: small GTPases cyclin' through G1. *Nat Cell Biol* 3:E250-1.
36. Couet, J., M. M. Belanger, E. Roussel, and M. C. Drolet. 2001. Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv Drug Deliv Rev* 49:223-35.
37. Couet, J., S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu, and M. P. Lisanti. 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272:6525-33.
38. Cross, B., M. Homoud, M. Link, C. Foote, A. C. Garlitski, J. Weinstock, and N. A. Estes, 3rd. 2011. The short QT syndrome. *J Interv Card Electrophysiol* 31:25-31.
39. Cheng, Z. J., R. D. Singh, D. K. Sharma, E. L. Holicky, K. Hanada, D. L. Marks, and R. E. Pagano. 2006. Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol Biol Cell* 17:3197-210.
40. Chiarugi, P., and E. Giannoni. 2008. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76:1352-64.
41. Chidlow, J. H., Jr., and W. C. Sessa. 2010. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res* 86:219-25.
42. Chien, K. R. 1999. Stress pathways and heart failure. *Cell* 98:555-8.
43. Cho, W. J., A. K. Chow, R. Schulz, and E. E. Daniel. 2010. Caveolin-1 exists and may function in cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 88:73-6.
44. Chow, A. K., J. Cena, A. F. El-Yazbi, B. D. Crawford, A. Holt, W. J. Cho, E. E. Daniel, and R. Schulz. 2007. Caveolin-1 inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 42:896-901.
45. Das, K., R. Y. Lewis, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1999. The membrane-spanning domains of caveolins-1 and -2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo. *J Biol Chem* 274:18721-8.
46. Day, M. L., R. G. Foster, K. C. Day, X. Zhao, P. Humphrey, P. Swanson, A. A. Postigo, S. H. Zhang, and D. C. Dean. 1997. Cell anchorage regulates apoptosis through the retinoblastoma tumor suppressor/E2F pathway. *J Biol Chem* 272:8125-8.
47. Del Pozo, M. A. 2004. Integrin signaling and lipid rafts. *Cell Cycle* 3:725-8.
48. del Pozo, M. A., N. B. Alderson, W. B. Kiosses, H. H. Chiang, R. G. Anderson, and M. A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* 303:839-42.
49. del Pozo, M. A., N. Balasubramanian, N. B. Alderson, W. B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R. G. Anderson, and M. A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* 7:901-8.
50. Del Pozo, M. A., W. B. Kiosses, N. B. Alderson, N. Meller, K. M. Hahn, and M. A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 4:232-9.
51. del Pozo, M. A., L. S. Price, N. B. Alderson, X. D. Ren, and M. A. Schwartz. 2000. Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J* 19:2008-14.

52. Del Pozo, M. A., and M. A. Schwartz. 2007. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* 17:246-50.
53. del Pozo, M. A., M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J. M. Serrador, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 29:3609-20.
54. Desjardins, F., I. Lobysheva, M. Pelat, B. Gallez, O. Feron, C. Dessy, and J. L. Balligand. 2008. Control of blood pressure variability in caveolin-1-deficient mice: role of nitric oxide identified in vivo through spectral analysis. *Cardiovasc Res* 79:527-36.
55. Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-511.
56. Diehl, J. A., F. Zindy, and C. J. Sherr. 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11:957-72.
57. Dietzen, D. J., W. R. Hastings, and D. M. Lublin. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem* 270:6838-42.
58. Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller, and T. V. Kurzchalia. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293:2449-52.
59. Dupree, P., R. G. Parton, G. Raposo, T. V. Kurzchalia, and K. Simons. 1993. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 12:1597-605.
60. Echarri, A., and M. A. Del Pozo. Quick Guide to Caveolae. *Curr Biol*.(in press).
61. Engelman, J. A., R. J. Lee, A. Karnezis, D. J. Bearss, M. Webster, P. Siegel, W. J. Muller, J. J. Windle, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 1998. Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J Biol Chem* 273:20448-55.
62. Engelman, J. A., C. C. Wykoff, S. Yasuhara, K. S. Song, T. Okamoto, and M. P. Lisanti. 1997. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J Biol Chem* 272:16374-81.
63. Engelman, J. A., X. L. Zhang, and M. P. Lisanti. 1998. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 436:403-10.
64. Epand, R. M., B. G. Sayer, and R. F. Epand. 2005. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *J Mol Biol* 345:339-50.
65. Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-35.
66. Fernandez-Hernando, C., J. Yu, A. Davalos, J. Prendergast, and W. C. Sessa. 2007. Endothelial-specific overexpression of caveolin-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 177:998-1003.
67. Fernandez, I., Y. Ying, J. Albanesi, and R. G. Anderson. 2002. Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11193-8.
68. Fernandez, M. A., C. Albor, M. Ingelmo-Torres, S. J. Nixon, C. Ferguson, T. Kurzchalia, F. Tebar, C. Enrich, R. G. Parton, and A. Pol. 2006. Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 313:1628-32.

69. Fiucci, G., D. Ravid, R. Reich, and M. Liscovitch. 2002. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21:2365-75.
70. Frank, P. G., H. Lee, D. S. Park, N. N. Tandon, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2004. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:98-105.
71. Freedman, V. H., and S. I. Shin. 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3:355-9.
72. Frisch, S. M., and H. Francis. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124:619-26.
73. Frisch, S. M., and E. Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9:701-6.
74. Frisch, S. M., and R. A. Screaton. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13:555-62.
75. Fu, Y., A. Hoang, G. Escher, R. G. Parton, Z. Krozowski, and D. Sviridov. 2004. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem* 279:14140-6.
76. Galbiati, F., J. A. Engelman, D. Volonte, X. L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou, Jr., B. Kneitz, W. Edelmann, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276:21425-33.
77. Galbiati, F., D. Volonte, J. A. Engelman, G. Watanabe, R. Burk, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 1998. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* 17:6633-48.
78. Galbiati, F., D. Volonte, O. Gil, G. Zanazzi, J. L. Salzer, M. Sargiacomo, P. E. Scherer, J. A. Engelman, A. Schlegel, M. Parenti, T. Okamoto, and M. P. Lisanti. 1998. Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10257-62.
79. Galbiati, F., D. Volonte, D. Meani, G. Milligan, D. M. Lublin, M. P. Lisanti, and M. Parenti. 1999. The dually acylated NH₂-terminal domain of g α 1 is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein α subunits in vivo. *J Biol Chem* 274:5843-50.
80. Garcia-Cardena, G., R. Fan, D. F. Stern, J. Liu, and W. C. Sessa. 1996. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271:27237-40.
81. Garg, A., and A. K. Agarwal. 2008. Caveolin-1: a new locus for human lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1183-5.
82. Gaus, K., S. Le Lay, N. Balasubramanian, and M. A. Schwartz. 2006. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J Cell Biol* 174:725-34.
83. Gazzerri, E., F. Sotgia, C. Bruno, M. P. Lisanti, and C. Minetti. 2010. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur J Hum Genet* 18:137-45.
84. Gera, J. F., I. K. Mellinshoff, Y. Shi, M. B. Rettig, C. Tran, J. H. Hsu, C. L. Sawyers, and A. K. Lichtenstein. 2004. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* 279:2737-46.
85. Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-32.

86. Gille, H., and J. Downward. 1999. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 274:22033-40.
87. Gioiosa, L., C. Raggi, L. Ricceri, J. F. Jasmin, P. G. Frank, F. Capozza, M. P. Lisanti, E. Alleva, M. Sargiacomo, and G. Laviola. 2008. Altered emotionality, spatial memory and cholinergic function in caveolin-1 knock-out mice. *Behav Brain Res* 188:255-62.
88. Gjoerup, O., J. Lukas, J. Bartek, and B. M. Willumsen. 1998. Rac and Cdc42 are potent stimulators of E2F-dependent transcription capable of promoting retinoblastoma susceptibility gene product hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 273:18812-8.
89. Glenney, J. R., Jr., and D. Soppet. 1992. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10517-21.
90. Glenney, J. R., Jr., and L. Zokas. 1989. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol* 108:2401-8.
91. Goetz, J. G., S. Minguet, I. Navarro-Lerida, J. J. Lazcano, R. Samaniego, E. Calvo, M. Tello, T. Osteso-Ibanez, T. Pellinen, A. Echarri, A. Cerezo, A. J. Klein-Szanto, R. Garcia, P. J. Keely, P. Sanchez-Mateos, E. Cukierman, and M. A. Del Pozo. 2011. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146:148-63.
92. Gonzalez-Munoz, E., C. Lopez-Iglesias, M. Calvo, M. Palacin, A. Zorzano, and M. Camps. 2009. Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 150:3493-502.
93. Gonzalez, E., A. Nagiel, A. J. Lin, D. E. Golan, and T. Michel. 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *J Biol Chem* 279:40659-69.
94. Goswami, D., K. Gowrishankar, S. Bilgrami, S. Ghosh, R. Raghupathy, R. Chadda, R. Vishwakarma, M. Rao, and S. Mayor. 2008. Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* 135:1085-97.
95. Grande-Garcia, A., A. Echarri, J. de Rooij, N. B. Alderson, C. M. Waterman-Storer, J. M. Valdivielso, and M. A. del Pozo. 2007. Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 177:683-94.
96. Gratton, J. P., J. Fontana, D. S. O'Connor, G. Garcia-Cardena, T. J. McCabe, and W. C. Sessa. 2000. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275:22268-72.
97. Gray, M. O., C. S. Long, J. E. Kalinyak, H. T. Li, and J. S. Karliner. 1998. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 40:352-63.
98. Guadamillas, M. C., A. Cerezo, and M. A. Del Pozo. 2011. Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer. *J Cell Sci* 124:3189-3197.
99. Gustincich, S., and C. Schneider. 1993. Serum deprivation response gene is induced by serum starvation but not by contact inhibition. *Cell Growth Differ* 4:753-60.
100. Hagiwara, Y., T. Sasaoka, K. Araishi, M. Imamura, H. Yorifuji, I. Nonaka, E. Ozawa, and T. Kikuchi. 2000. Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum Mol Genet* 9:3047-54.
101. Hancock, J. F. 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:456-62.

102. Hansen, C. G., N. A. Bright, G. Howard, and B. J. Nichols. 2009. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat Cell Biol* 11:807-14.
103. Hansen, C. G., and B. J. Nichols. 2010. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20:177-86.
104. Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo, and D. C. Dean. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98:859-69.
105. Harris, J., D. Werling, M. Koss, P. Monaghan, G. Taylor, and C. J. Howard. 2002. Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells. *Immunology* 105:190-5.
106. Harvey, P. A., and L. A. Leinwand. 2011. The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol* 194:355-65.
107. Hawkins, P. T., A. Eguinoa, R. G. Qiu, D. Stokoe, F. T. Cooke, R. Walters, S. Wennstrom, L. Claesson-Welsh, T. Evans, M. Symons, and et al. 1995. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* 5:393-403.
108. Hayashi, K., S. Matsuda, K. Machida, T. Yamamoto, Y. Fukuda, Y. Nimura, T. Hayakawa, and M. Hamaguchi. 2001. Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 61:2361-4.
109. Hayer, A., M. Stoeber, C. Bissig, and A. Helenius. 2010. Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic* 11:361-82.
110. Head, B. P., H. H. Patel, D. M. Roth, F. Murray, J. S. Swaney, I. R. Niesman, M. G. Farquhar, and P. A. Insel. 2006. Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem* 281:26391-9.
111. Heineke, J., and J. D. Molkentin. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:589-600.
112. Hill, J. A., and E. N. Olson. 2008. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358:1370-80.
113. Hill, M. M., M. Bastiani, R. Luetterforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S. J. Nixon, P. Walser, D. Abankwa, V. M. Oorschot, S. Martin, J. F. Hancock, and R. G. Parton. 2008. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132:113-24.
114. Hirsch, E., L. Barberis, M. Brancaccio, O. Azzolino, D. Xu, J. M. Kyriakis, L. Silengo, F. G. Giancotti, G. Tarone, R. Fassler, and F. Altruda. 2002. Defective Rac-mediated proliferation and survival after targeted mutation of the beta1 integrin cytodomain. *J Cell Biol* 157:481-92.
115. Hnasko, R., and M. P. Lisanti. 2003. The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv* 3:445-64.
116. Hochegger, H., S. Takeda, and T. Hunt. 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:910-6.
117. Hoffman, G. R., N. Nassar, and R. A. Cerione. 2000. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100:345-56.
118. Huang, S., C. S. Chen, and D. E. Ingber. 1998. Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol Biol Cell* 9:3179-93.
119. Humphries, M. J. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-39.

120. Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-87.
121. Ishizaka, N., K. K. Griendling, B. Lassegue, and R. W. Alexander. 1998. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension* 32:459-66.
122. Izumi, Y., S. Hirai, Y. Tamai, A. Fujise-Matsuoka, Y. Nishimura, and S. Ohno. 1997. A protein kinase Cdelta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *J Biol Chem* 272:7381-9.
123. Jacquemet, V., and C. S. Henriquez. 2007. Modelling cardiac fibroblasts: interactions with myocytes and their impact on impulse propagation. *Europace* 9 Suppl 6:vi29-37.
124. Jansa, P., and I. Grummt. 1999. Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Mol Gen Genet* 262:508-14.
125. Jansa, P., S. W. Mason, U. Hoffmann-Rohrer, and I. Grummt. 1998. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J* 17:2855-64.
126. Jasmin, J. F., M. Yang, L. Iacovitti, and M. P. Lisanti. 2009. Genetic ablation of caveolin-1 increases neural stem cell proliferation in the subventricular zone (SVZ) of the adult mouse brain. *Cell Cycle* 8:3978-83.
127. Jay, S. M., E. Skokos, F. Laiwalla, M. M. Krady, and T. R. Kyriakides. 2007. Foreign body giant cell formation is preceded by lamellipodia formation and can be attenuated by inhibition of Rac1 activation. *Am J Pathol* 171:632-40.
128. Joyce, D., B. Bouzahzah, M. Fu, C. Albanese, M. D'Amico, J. Steer, J. U. Klein, R. J. Lee, J. E. Segall, J. K. Westwick, C. J. Der, and R. G. Pestell. 1999. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 274:25245-9.
129. Kastan, M. B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-23.
130. Kato, K., Y. Hida, M. Miyamoto, H. Hashida, T. Shinohara, T. Itoh, S. Okushiba, S. Kondo, and H. Katoh. 2002. Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 94:929-33.
131. Kiess, M., R. M. Gill, and P. A. Hamel. 1995. Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRB)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. *Cell Growth Differ* 6:1287-98.
132. Kim, Y. N., G. J. Wiepz, A. G. Guadarrama, and P. J. Bertics. 2000. Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. Enhanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status. *J Biol Chem* 275:7481-91.
133. Kirkham, M., S. J. Nixon, M. T. Howes, L. Abi-Rached, D. E. Wakeham, M. Hanzal-Bayer, C. Ferguson, M. M. Hill, M. Fernandez-Rojo, D. A. Brown, J. F. Hancock, F. M. Brodsky, and R. G. Parton. 2008. Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis. *J Cell Sci* 121:2075-86.
134. Kiss, A. L., A. Turi, N. Muller, O. Kantor, and E. Botos. 2002. Caveolae and caveolin isoforms in rat peritoneal macrophages. *Micron* 33:75-93.
135. Kleber, A. G., and Y. Rudy. 2004. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* 84:431-88.
136. Klein, E. A., Y. Yung, P. Castagnino, D. Kothapalli, and R. K. Assoian. 2007. Cell adhesion, cellular tension, and cell cycle control. *Methods Enzymol* 426:155-75.

137. Kogo, H., and T. Fujimoto. 2000. Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing. *FEBS Lett* 465:119-23.
138. Koleske, A. J., D. Baltimore, and M. P. Lisanti. 1995. Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1381-5.
139. Krajewska, W. M., and I. Maslowska. 2004. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 9:195-220.
140. Krieger, M. H., A. Di Lorenzo, C. Teutsch, K. Kauser, and W. C. Sessa. 2010. Telmisartan regresses left ventricular hypertrophy in caveolin-1-deficient mice. *Lab Invest* 90:1573-81.
141. Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras, and R. Beliveau. 2004. Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279:52132-40.
142. Land, H., L. F. Parada, and R. A. Weinberg. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:596-602.
143. Le Gall, M., D. Grall, J. C. Chambard, J. Pouyssegur, and E. Van Obberghen-Schilling. 1998. An anchorage-dependent signal distinct from p42/44 MAP kinase activation is required for cell cycle progression. *Oncogene* 17:1271-7.
144. Le Lay, S., and T. V. Kurzchalia. 2005. Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim Biophys Acta* 1746:322-33.
145. Lee, H., D. S. Park, B. Razani, R. G. Russell, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol* 161:1357-69.
146. Lee, H., D. Volonte, F. Galbiati, P. Iyengar, D. M. Lublin, D. B. Bregman, M. T. Wilson, R. Campos-Gonzalez, B. Bouzahzah, R. G. Pestell, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2000. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol Endocrinol* 14:1750-75.
147. Lee, H., S. E. Woodman, J. A. Engelman, D. Volonte, F. Galbiati, H. L. Kaufman, D. M. Lublin, and M. P. Lisanti. 2001. Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J Biol Chem* 276:35150-8.
148. Lee, S. W., C. L. Reimer, P. Oh, D. B. Campbell, and J. E. Schnitzer. 1998. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16:1391-7.
149. Li, J., B. A. Ballif, A. M. Powelka, J. Dai, S. P. Gygi, and V. W. Hsu. 2005. Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation-dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration. *Dev Cell* 9:663-73.
150. Li, L., G. Yang, S. Ebara, T. Satoh, Y. Nasu, T. L. Timme, C. Ren, J. Wang, S. A. Tahir, and T. C. Thompson. 2001. Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res* 61:4386-92.
151. Li, S., F. Galbiati, D. Volonte, M. Sargiacomo, J. A. Engelman, K. Das, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1998. Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett* 434:127-34.

152. Li, S., T. Okamoto, M. Chun, M. Sargiacomo, J. E. Casanova, S. H. Hansen, I. Nishimoto, and M. P. Lisanti. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* 270:15693-701.
153. Li, S., R. Seitz, and M. P. Lisanti. 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271:3863-8.
154. Liang, J., and J. M. Slingerland. 2003. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2:339-45.
155. Lin, M. I., J. Yu, T. Murata, and W. C. Sessa. 2007. Caveolin-1-deficient mice have increased tumor microvascular permeability, angiogenesis, and growth. *Cancer Res* 67:2849-56.
156. Lisanti, M. P., P. E. Scherer, Z. Tang, and M. Sargiacomo. 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol* 4:231-5.
157. Lisanti, M. P., Z. L. Tang, and M. Sargiacomo. 1993. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol* 123:595-604.
158. Liu, L., D. Brown, M. McKee, N. K. Lebrasseur, D. Yang, K. H. Albrecht, K. Ravid, and P. F. Pilch. 2008. Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab* 8:310-7.
159. Liu, L., and P. F. Pilch. 2008. A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem* 283:4314-22.
160. Liu, P., M. Rudick, and R. G. Anderson. 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* 277:41295-8.
161. London, B. 2001. Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12:1089-91.
162. Lundberg, A. S., and R. A. Weinberg. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18:753-61.
163. Maguy, A., T. E. Hebert, and S. Nattel. 2006. Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res* 69:798-807.
164. Malumbres, M., and M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9:153-66.
165. Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630-41.
166. Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1:222-31.
167. Malumbres, M., and A. Pellicer. 1998. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3:d887-912.
168. Mangoni, M. E., and J. Nargeot. 2008. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88:919-82.
169. Martinez-Gac, L., M. Marques, Z. Garcia, M. R. Campanero, and A. C. Carrera. 2004. Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol* 24:2181-9.
170. Massague, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432:298-306.

171. Mayer, B., T. Kaiser, P. Kempt, T. Cornelius, S. R. Holmer, and H. Schunkert. 2002. Molecular cloning and functional characterization of the upstream rat atrial natriuretic peptide promoter. *J Hypertens* 20:219-28.
172. Mayoral, R., A. Fernandez-Martinez, R. Roy, L. Bosca, and P. Martin-Sanz. 2007. Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology* 46:813-22.
173. McMahon, K. A., H. Zajicek, W. P. Li, M. J. Peyton, J. D. Minna, V. J. Hernandez, K. Luby-Phelps, and R. G. Anderson. 2009. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J* 28:1001-15.
174. Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J. K. Westwick, and F. G. Giancotti. 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* 8:115-27.
175. Mineo, C., Y. S. Ying, C. Chapline, S. Jaken, and R. G. Anderson. 1998. Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol* 141:601-10.
176. Monier, S., D. J. Dietzen, W. R. Hastings, D. M. Lublin, and T. V. Kurzchalia. 1996. Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett* 388:143-9.
177. Monier, S., R. G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske, and T. V. Kurzchalia. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6:911-27.
178. Mora, R., V. L. Bonilha, A. Marmorstein, P. E. Scherer, D. Brown, M. P. Lisanti, and E. Rodriguez-Boulan. 1999. Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J Biol Chem* 274:25708-17.
179. Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261-91.
180. Moro, L., M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, and P. Defilippi. 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* 17:6622-32.
181. Muller, G., and W. Frick. 1999. Signalling via caveolin: involvement in the cross-talk between phosphoinositolglycans and insulin. *Cell Mol Life Sci* 56:945-70.
182. Murata, T., M. I. Lin, Y. Huang, J. Yu, P. M. Bauer, F. J. Giordano, and W. C. Sessa. 2007. Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J Exp Med* 204:2373-82.
183. Murthy, K. S., and G. M. Makhlof. 2000. Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. *J Biol Chem* 275:30211-9.
184. Neidhold, S., B. Eichhorn, M. Kasper, U. Ravens, and A. J. Kaumann. 2007. The function of alpha- and beta-adrenoceptors of the saphenous artery in caveolin-1 knockout and wild-type mice. *Br J Pharmacol* 150:261-70.
185. Nerbonne, J. M., C. G. Nichols, T. L. Schwarz, and D. Escande. 2001. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circ Res* 89:944-56.
186. Nethe, M., and P. L. Hordijk. 2011. A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal adhesions. *Cell Adh Migr* 5:59-64.

187. Nishiyama, K., B. D. Trapp, T. Ikezu, R. M. Ransohoff, T. Tomita, T. Iwatsubo, I. Kanazawa, K. K. Hsiao, M. P. Lisanti, and T. Okamoto. 1999. Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19:6538-48.
188. Norbury, C., and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61:441-70.
189. Nupponen, N. N., L. Kakkola, P. Koivisto, and T. Visakorpi. 1998. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* 153:141-8.
190. O'Toole, T. E., Y. Katagiri, R. J. Faull, K. Peter, R. Tamura, V. Quaranta, J. C. Loftus, S. J. Shattil, and M. H. Ginsberg. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 124:1047-59.
191. Ogata, T., T. Ueyama, K. Isodono, M. Tagawa, N. Takehara, T. Kawashima, K. Harada, T. Takahashi, T. Shioi, H. Matsubara, and H. Oh. 2008. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Mol Cell Biol* 28:3424-36.
192. Okamoto, T., A. Schlegel, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-22.
193. Olofsson, B. 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11:545-54.
194. Olson, M. F., A. Ashworth, and A. Hall. 1995. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269:1270-2.
195. Palade, G. E. 1953. Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.* 24:1424.
196. Palazzo, A. F., C. H. Eng, D. D. Schlaepfer, E. E. Marcantonio, and G. G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* 303:836-9.
197. Parat, M. O., B. Anand-Apte, and P. L. Fox. 2003. Differential caveolin-1 polarization in endothelial cells during migration in two and three dimensions. *Mol Biol Cell* 14:3156-68.
198. Park, D. S., A. W. Cohen, P. G. Frank, B. Razani, H. Lee, T. M. Williams, M. Chandra, J. Shirani, A. P. De Souza, B. Tang, L. A. Jelicks, S. M. Factor, L. M. Weiss, H. B. Tanowitz, and M. P. Lisanti. 2003. Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry* 42:15124-31.
199. Park, D. S., H. Lee, P. G. Frank, B. Razani, A. V. Nguyen, A. F. Parlow, R. G. Russell, J. Hult, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Mol Biol Cell* 13:3416-30.
200. Park, D. S., S. E. Woodman, W. Schubert, A. W. Cohen, P. G. Frank, M. Chandra, J. Shirani, B. Razani, B. Tang, L. A. Jelicks, S. M. Factor, L. M. Weiss, H. B. Tanowitz, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am J Pathol* 160:2207-17.
201. Parolini, I., M. Sargiacomo, F. Galbiati, G. Rizzo, F. Grignani, J. A. Engelman, T. Okamoto, T. Ikezu, P. E. Scherer, R. Mora, E. Rodriguez-Boulton, C. Peschle, and M. P. Lisanti. 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J Biol Chem* 274:25718-25.
202. Parton, R. G. 1996. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* 8:542-8.

203. Parton, R. G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:185-94.
204. Patani, N., M. B. Lambros, R. Natrajan, K. J. Dedes, F. C. Geyer, E. Ward, L. A. Martin, M. Dowsett, and J. S. Reis-Filho. 2011. Non-existence of caveolin-1 gene mutations in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*
205. Patel, H. H., Y. M. Tsutsumi, B. P. Head, I. R. Niesman, M. Jennings, Y. Horikawa, D. Huang, A. L. Moreno, P. M. Patel, P. A. Insel, and D. M. Roth. 2007. Mechanisms of cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for caveolae and caveolin-1. *FASEB J* 21:1565-74.
206. Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3:473-83.
207. Pellioux, C., A. Foletti, G. Peduto, J. F. Aubert, J. Nussberger, F. Beermann, H. R. Brunner, and T. Pedrazzini. 2001. Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. *J Clin Invest* 108:1843-51.
208. Pines, J. 1999. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1:E73-9.
209. Pojoga, L. H., T. M. Yao, S. Sinha, R. L. Ross, J. C. Lin, J. D. Raffetto, G. K. Adler, G. H. Williams, and R. A. Khalil. 2008. Effect of dietary sodium on vasoconstriction and eNOS-mediated vascular relaxation in caveolin-1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H1258-65.
210. Pol, A., S. Martin, M. A. Fernandez, M. Ingelmo-Torres, C. Ferguson, C. Enrich, and R. G. Parton. 2005. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell* 16:2091-105.
211. Radel, C., M. Carlile-Klusacek, and V. Rizzo. 2007. Participation of caveolae in beta1 integrin-mediated mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 358:626-31.
212. Radel, C., and V. Rizzo. 2005. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H936-45.
213. Radeva, G., T. Petrocelli, E. Behrend, C. Leung-Hagesteijn, J. Filmus, J. Slingerland, and S. Dedhar. 1997. Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* 272:13937-44.
214. Rajjayabun, P. H., S. Garg, G. C. Durkan, R. Charlton, M. C. Robinson, and J. K. Mellon. 2001. Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer. *Urology* 58:811-4.
215. Rane, S. G., P. Dubus, R. V. Mettus, E. J. Galbreath, G. Boden, E. P. Reddy, and M. Barbacid. 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22:44-52.
216. Razani, B., T. P. Combs, X. B. Wang, P. G. Frank, D. S. Park, R. G. Russell, M. Li, B. Tang, L. A. Jelicks, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 277:8635-47.
217. Razani, B., J. A. Engelman, X. B. Wang, W. Schubert, X. L. Zhang, C. B. Marks, F. Macaluso, R. G. Russell, M. Li, R. G. Pestell, D. Di Vizio, H. Hou, Jr., B. Kneitz, G. Lagaud, G. J. Christ, W. Edelmann, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276:38121-38.
218. Razani, B., and M. P. Lisanti. 2001. Caveolins and caveolae: molecular and functional relationships. *Exp Cell Res* 271:36-44.

219. Razani, B., C. S. Rubin, and M. P. Lisanti. 1999. Regulation of cAMP-mediated signal transduction via interaction of caveolins with the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* 274:26353-60.
220. Razani, B., X. B. Wang, J. A. Engelman, M. Battista, G. Lagaud, X. L. Zhang, B. Kneitz, H. Hou, Jr., G. J. Christ, W. Edelmann, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22:2329-44.
221. Razani, B., S. E. Woodman, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54:431-67.
222. Reid, S. W., and T. L. 2009. Isolation, microinjection and transfer of mouse blastocysts. *In* R. Kühn and W. W. (ed.), *Gene Knockout protocols*, vol. 530

Humana Press.

223. Ren, X. D., W. B. Kiosses, and M. A. Schwartz. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18:578-85.
224. Ren, X. D., R. Wang, Q. Li, L. A. Kahek, K. Kaibuchi, and R. A. Clark. 2004. Disruption of Rho signal transduction upon cell detachment. *J Cell Sci* 117:3511-8.
225. Ren, Z., W. Liang, C. Chen, H. Yang, P. C. Singhal, and G. Ding. 2011. Angiotensin II induces nephrin dephosphorylation and podocyte injury: Role of caveolin-1. *Cell Signal*.
226. Ridley, A. J. 2001. Cyclin' round the cell with Rac. *Dev Cell* 1:160-1.
227. Robenek, H., G. Weissen-Plenz, and N. J. Severs. 2008. Freeze-fracture replica immunolabelling reveals caveolin-1 in the human cardiomyocyte plasma membrane. *J Cell Mol Med* 12:2519-21.
228. Rohr, S. 2004. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc Res* 62:309-22.
229. Rosengren, B. I., A. Rippe, C. Rippe, D. Venturoli, K. Sward, and B. Rippe. 2006. Transvascular protein transport in mice lacking endothelial caveolae. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H1371-7.
230. Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68:673-82.
231. Ruley, H. E. 1983. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304:602-6.
232. Sahai, E., and C. J. Marshall. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2:133-42.
233. Salama, G., and B. London. 2007. Mouse models of long QT syndrome. *J Physiol* 578:43-53.
234. Salanueva, I. J., A. Cerezo, M. C. Guadamillas, and M. A. del Pozo. 2007. Integrin regulation of caveolin function. *J Cell Mol Med* 11:969-80.
235. Sanguinetti, A. R., H. Cao, and C. Corley Mastick. 2003. Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J* 376:159-68.
236. Sanguinetti, A. R., and C. C. Mastick. 2003. c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal* 15:289-98.

237. Sargiacomo, M., P. E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K. S. Song, M. C. Sanders, and M. P. Lisanti. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9407-11.
238. Sastry, S. K., and A. F. Horwitz. 1996. Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response. *Dev Biol* 180:455-67.
239. Scheel, J., J. Srinivasan, U. Honnert, A. Henske, and T. V. Kurzchalia. 1999. Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* 1:127-9.
240. Scherer, P. E., R. Y. Lewis, D. Volonte, J. A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D. S. Kohtz, E. van Donselaar, P. Peters, and M. P. Lisanti. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272:29337-46.
241. Scherer, P. E., T. Okamoto, M. Chun, I. Nishimoto, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:131-5.
242. Scherer, P. E., Z. Tang, M. Chun, M. Sargiacomo, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1995. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 270:16395-401.
243. Schlegel, A., P. Arvan, and M. P. Lisanti. 2001. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276:4398-408.
244. Schlegel, A., and M. P. Lisanti. 2000. A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem* 275:21605-17.
245. Schlegel, A., R. B. Schwab, P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1999. A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol Chem* 274:22660-7.
246. Schmidt, A., and A. Hall. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587-609.
247. Schnee, J. M., and W. A. Hsueh. 2000. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 46:264-8.
248. Schnitzer, J. E. 2001. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 49:265-80.
249. Schubert, W., P. G. Frank, S. E. Woodman, H. Hyogo, D. E. Cohen, C. W. Chow, and M. P. Lisanti. 2002. Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem* 277:40091-8.
250. Schwartz, B. R., A. Karsan, T. Bombeli, and J. M. Harlan. 1999. A novel beta 1 integrin-dependent mechanism of leukocyte adherence to apoptotic cells. *J Immunol* 162:4842-8.
251. Schwartz, M. A. 2001. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 11:466-70.
252. Schwartz, M. A. 1997. Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol* 139:575-8.

253. Shakirova, Y., J. Bonnevier, S. Albinsson, M. Adner, B. Rippe, J. Broman, A. Arner, and K. Sward. 2006. Increased Rho activation and PKC-mediated smooth muscle contractility in the absence of caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1326-35.
254. Sharma, P., R. Varma, R. C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, and S. Mayor. 2004. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116:577-89.
255. Shatz, M., and M. Liscovitch. 2008. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int J Radiat Biol* 84:177-89.
256. Shaul, P. W., and R. G. Anderson. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *Am J Physiol* 275:L843-51.
257. Sherr, C. J. 2000. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect* 96:73-92.
258. Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-12.
259. Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18:2699-711.
260. Shimizu, W., and M. Horie. 2011. Phenotypic manifestations of mutations in genes encoding subunits of cardiac potassium channels. *Circ Res* 109:97-109.
261. Simons, K., and M. J. Gerl. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:688-99.
262. Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-72.
263. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-9.
264. Sinha, B., D. Koster, R. Ruez, P. Gonnord, M. Bastiani, D. Abankwa, R. V. Stan, G. Butler-Browne, B. Védie, L. Johannes, N. Morone, R. G. Parton, G. Raposo, P. Sens, C. Lamaze, and P. Nassoy. 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144:402-13.
265. Smart, E. J., G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto, and M. P. Lisanti. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19:7289-304.
266. Smart, E. J., Y. Ying, W. C. Donzell, and R. G. Anderson. 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271:29427-35.
267. Song, K. S., M. Sargiacomo, F. Galbiati, M. Parenti, and M. P. Lisanti. 1997. Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 43:293-303.
268. Song, K. S., P. E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D. S. Kohtz, and M. P. Lisanti. 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271:15160-5.
269. Song, K. S., Z. Tang, S. Li, and M. P. Lisanti. 1997. Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. *J Biol Chem* 272:4398-403.
270. Sonveaux, P., P. Martinive, J. DeWever, Z. Batova, G. Daneau, M. Pelat, P. Ghisdal, V. Gregoire, C. Dessy, J. L. Balligand, and O. Feron. 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 95:154-61.

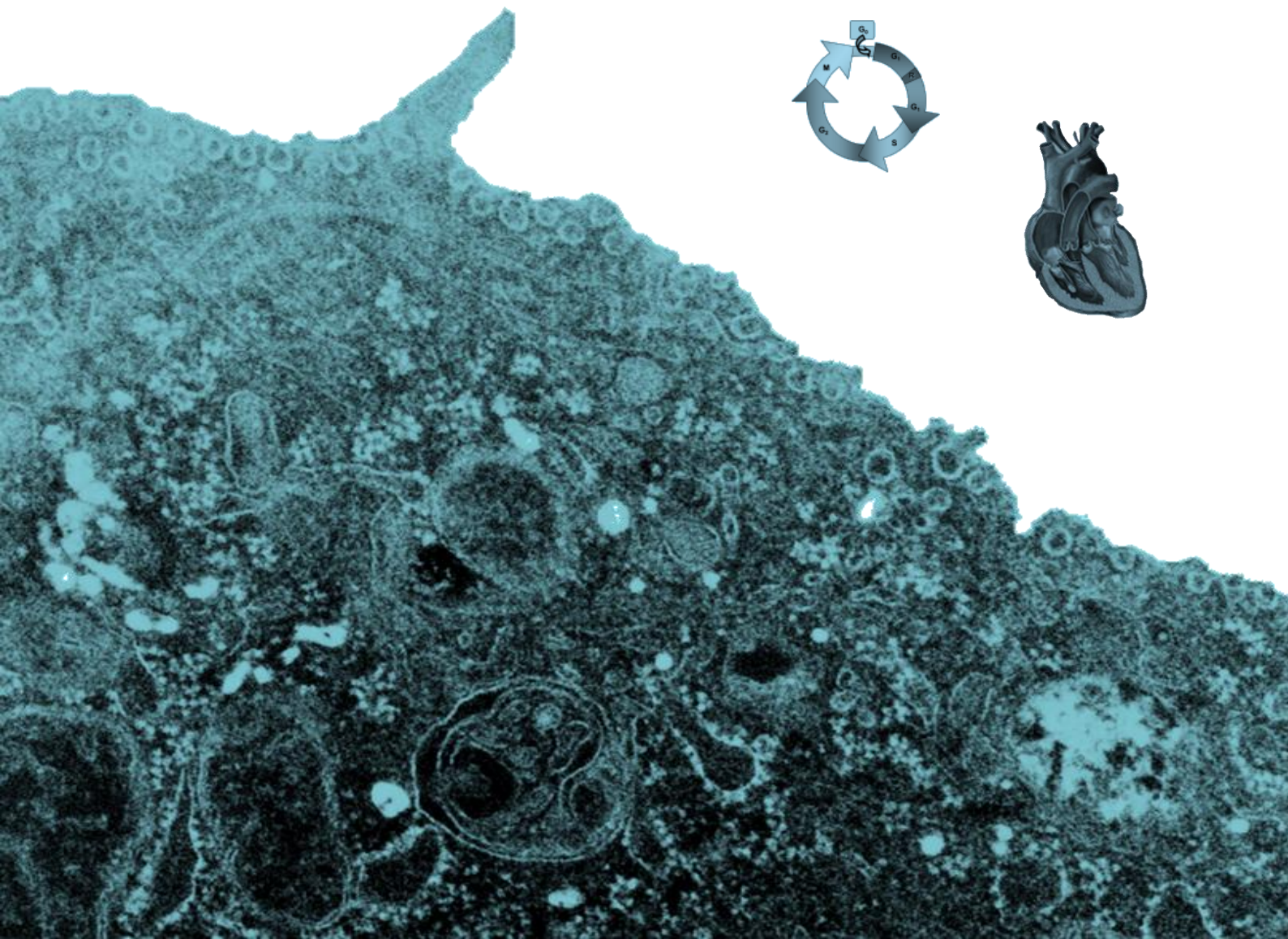
271. Sotgia, F., W. Schubert, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2006. Genetic ablation of caveolin-1 in mammary epithelial cells increases milk production and hyper-activates STAT5a signaling. *Cancer Biol Ther* 5:292-7.
272. Sowa, G., M. Pypaert, D. Fulton, and W. C. Sessa. 2003. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6511-6.
273. Spisni, E., V. Tomasi, A. Cestaro, and S. C. Tosatto. 2005. Structural insights into the function of human caveolin 1. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1383-90.
274. Stan, R. V. 2005. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1746:334-48.
275. Stevaux, O., and N. J. Dyson. 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14:684-91.
276. Sun, A., L. Bagella, S. Tutton, G. Romano, and A. Giordano. 2007. From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem* 102:1400-4.
277. Sunaga, N., K. Miyajima, M. Suzuki, M. Sato, M. A. White, R. D. Ramirez, J. W. Shay, A. F. Gazdar, and J. D. Minna. 2004. Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Res* 64:4277-85.
278. Symons, M., and J. Settleman. 2000. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* 10:415-9.
279. Tagawa, M., T. Ueyama, T. Ogata, N. Takehara, N. Nakajima, K. Isodono, S. Asada, T. Takahashi, H. Matsubara, and H. Oh. 2008. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C490-8.
280. Tahir, S. A., G. Yang, S. Ebara, T. L. Timme, T. Satoh, L. Li, A. Goltsov, M. Ittmann, J. D. Morrisett, and T. C. Thompson. 2001. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 61:3882-5.
281. Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110:599-11.
282. Tang, Z., T. Okamoto, P. Boontrakulpoontawee, T. Katada, A. J. Otsuka, and M. P. Lisanti. 1997. Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *J Biol Chem* 272:2437-45.
283. Tang, Z., P. E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D. S. Kohtz, I. Nishimoto, H. F. Lodish, and M. P. Lisanti. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271:2255-61.
284. Tang, Z. L., P. E. Scherer, and M. P. Lisanti. 1994. The primary sequence of murine caveolin reveals a conserved consensus site for phosphorylation by protein kinase C. *Gene* 147:299-300.
285. Tetsu, O., and F. McCormick. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-6.
286. Thompson, T. C., T. L. Timme, L. Li, and A. Goltsov. 1999. Caveolin-1, a metastasis-related gene that promotes cell survival in prostate cancer. *Apoptosis* 4:233-7.
287. Tresguerres, J. 2005. *Fisiología humana*. Editorial McGraw Hill.

288. Uittenbogaard, A., and E. J. Smart. 2000. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *J Biol Chem* 275:25595-9.
289. Valasek, M. A., J. Weng, P. W. Shaul, R. G. Anderson, and J. J. Repa. 2005. Caveolin-1 is not required for murine intestinal cholesterol transport. *J Biol Chem* 280:28103-9.
290. Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11:2295-322.
291. Vicente-Manzanares, M., M. Rey, D. R. Jones, D. Sancho, M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, M. A. del Pozo, M. Yanez-Mo, A. M. de Ana, A. C. Martinez, I. Merida, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol* 163:4001-12.
292. Villanueva, J., Y. Yung, J. L. Walker, and R. K. Assoian. 2007. ERK activity and G1 phase progression: identifying dispensable versus essential activities and primary versus secondary targets. *Mol Biol Cell* 18:1457-63.
293. Vinten, J., M. Voldstedlund, H. Clausen, K. Christiansen, J. Carlsen, and J. Trantum-Jensen. 2001. A 60-kDa protein abundant in adipocyte caveolae. *Cell Tissue Res* 305:99-106.
294. Vivanco, I., and C. L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
295. Volonte, D., F. Galbiati, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2001. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 276:8094-103.
296. Walker, J. L., and R. K. Assoian. 2005. Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. *Cancer Metastasis Rev* 24:383-93.
297. Wang, L. H. 2004. Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med* 71:361-7.
298. Wang, R., L. D. Ferrell, S. Faouzi, J. J. Maher, and J. M. Bishop. 2001. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol* 153:1023-34.
299. Wang, X. B., H. Lee, F. Capozza, S. Marmon, F. Sotgia, J. W. Brooks, R. Campos-Gonzalez, and M. P. Lisanti. 2004. Tyrosine phosphorylation of caveolin-2 at residue 27: differences in the spatial and temporal behavior of phospho-Cav-2 (pY19 and pY27). *Biochemistry* 43:13694-706.
300. Wary, K. K., A. Mariotti, C. Zurzolo, and F. G. Giancotti. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94:625-34.
301. Way, M., and R. G. Parton. 1996. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 378:108-12.
302. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-30.
303. Welsh, C. F., K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M. A. Schwartz, and R. K. Assoian. 2001. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 3:950-7.

304. Wiechen, K., C. Sers, A. Agoulnik, K. Arlt, M. Dietel, P. M. Schlag, and U. Schneider. 2001. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am J Pathol* 158:833-9.
305. Wilke, A., R. Funck, H. Rupp, and C. G. Brilla. 1996. Effect of the renin-angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstitium in heart failure. *Basic Res Cardiol* 91 Suppl 2:79-84.
306. Williams, T. M., M. W. Cheung, D. S. Park, B. Razani, A. W. Cohen, W. J. Muller, D. Di Vizio, N. G. Chopra, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2003. Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell* 14:1027-42.
307. Williams, T. M., G. S. Hassan, J. Li, A. W. Cohen, F. Medina, P. G. Frank, R. G. Pestell, D. Di Vizio, M. Loda, and M. P. Lisanti. 2005. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem* 280:25134-45.
308. Williams, T. M., H. Lee, M. W. Cheung, A. W. Cohen, B. Razani, P. Iyengar, P. E. Scherer, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2004. Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/CAV-1 in mammary epithelial cell hyperplasia. *J Biol Chem* 279:24745-56.
309. Williams, T. M., and M. P. Lisanti. 2005. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C494-506.
310. Williams, T. M., and M. P. Lisanti. 2004. The caveolin proteins. *Genome Biol* 5:214.
311. Williams, T. M., F. Medina, I. Badano, R. B. Hazan, J. Hutchinson, W. J. Muller, N. G. Chopra, P. E. Scherer, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2004. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem* 279:51630-46.
312. Woodman, S. E., A. W. Ashton, W. Schubert, H. Lee, T. M. Williams, F. A. Medina, J. B. Wyckoff, T. P. Combs, and M. P. Lisanti. 2003. Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am J Pathol* 162:2059-68.
313. Woodman, S. E., M. W. Cheung, M. Tarr, A. C. North, W. Schubert, G. Lagaud, C. B. Marks, R. G. Russell, G. S. Hassan, S. M. Factor, G. J. Christ, and M. P. Lisanti. 2004. Urogenital alterations in aged male caveolin-1 knockout mice. *J Urol* 171:950-7.
314. Woodman, S. E., D. S. Park, A. W. Cohen, M. W. Cheung, M. Chandra, J. Shirani, B. Tang, L. A. Jelicks, R. N. Kitsis, G. J. Christ, S. M. Factor, H. B. Tanowitz, and M. P. Lisanti. 2002. Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem* 277:38988-97.
315. Wunderlich, C., K. Schober, S. A. Lange, M. Drab, R. C. Braun-Dullaeus, M. Kasper, C. Schwencke, A. Schmeisser, and R. H. Strasser. 2006. Disruption of caveolin-1 leads to enhanced nitrosative stress and severe systolic and diastolic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 340:702-8.
316. Wunderlich, C., K. Schober, A. Schmeisser, C. Heerwagen, A. K. Tausche, N. Steinbronn, A. Brandt, M. Kasper, C. Schwencke, R. C. Braun-Dullaeus, and R. H. Strasser. 2008. The adverse cardiopulmonary phenotype of caveolin-1 deficient mice is mediated by a dysfunctional endothelium. *J Mol Cell Cardiol* 44:938-47.
317. Wyse, B. D., I. A. Prior, H. Qian, I. C. Morrow, S. Nixon, C. Muncke, T. V. Kurzchalia, W. G. Thomas, R. G. Parton, and J. F. Hancock. 2003. Caveolin interacts with the angiotensin II type 1 receptor during exocytic transport but not at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278:23738-46.

318. Xu, X. L., L. C. Wu, F. Du, A. Davis, M. Peyton, Y. Tomizawa, A. Maitra, G. Tomlinson, A. F. Gazdar, B. E. Weissman, A. M. Bowcock, R. Baer, and J. D. Minna. 2001. Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers. *Cancer Res* 61:7943-9.
319. Yamada, E. 1955. The fine structures of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1:445-458.
320. Yamada, K. M., and S. Even-Ram. 2002. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat Cell Biol* 4:E75-6.
321. Yamamoto, M., Y. Toya, C. Schwencke, M. P. Lisanti, M. G. Myers, Jr., and Y. Ishikawa. 1998. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273:26962-8.
322. Yamazaki, T., I. Komuro, I. Shiojima, and Y. Yazaki. 1999. The molecular mechanism of cardiac hypertrophy and failure. *Ann N Y Acad Sci* 874:38-48.
323. Yu, J. Y., J. Taylor, S. L. DeRuiter, A. B. Vojtek, and D. L. Turner. 2003. Simultaneous inhibition of GSK3alpha and GSK3beta using hairpin siRNA expression vectors. *Mol Ther* 7:228-36.
324. Zhang, W., B. Razani, Y. Altschuler, B. Bouzahzah, K. E. Mostov, R. G. Pestell, and M. P. Lisanti. 2000. Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J Biol Chem* 275:20717-25.
325. Zhao, Y. Y., Y. Liu, R. V. Stan, L. Fan, Y. Gu, N. Dalton, P. H. Chu, K. Peterson, J. Ross, Jr., and K. R. Chien. 2002. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11375-80.

ANEXO: Publicaciones



Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis:

- Cerezo*, **M.C. Guadamillas***, J.G. Goetz, S. Sánchez-Perales, E. Klein, R. Assoian and M. A. del Pozo (* = *these authors contributed equally to this work*). **“Absence of Caveolin-1 Increases Proliferation and Anchorage-Independent Growth by Rac-Dependent, Erk-independent Mechanism”**. *Mol Cell Biol.* 2009 Sep; 29 (18): 5049-59.
- **M.C. Guadamillas***, A. Cerezo*, M.A. del Pozo. (* = *these authors contributed equally to this work*). **“Overcoming anoikis - pathways to anchorage-independent growth in cancer”**. *J Cell Sci.* 2011 Oct 1; 124 (Pt 19): 3189-97. (Review).
- I.J. Salanueva*, A. Cerezo*, **M.C. Guadamillas**, M.A. del Pozo. **“Integrin regulation of caveolin function”**. *J Cell Mol Med.* 2007 Sep-Oct; 11 (5): 969-80. (Review).

Publicaciones no relacionadas con el trabajo de Tesis:

- P. Gonzalo, **M.C. Guadamillas**, M.V. Hernández-Riquer, A. Pollán, A. Grande-García, R.A. Bartolomé, A. Vasanji, C. Ambrogio, R. Chiarle, J. Teixidó, J. Risteli, S.S. Apte, M.A. del Pozo, and A.G. Arroyo. **“MT1-MMP is required for myeloid cell fusion via regulation of Rac1 signaling”**. *Dev Cell.* 2010 Jan 19; 18 (1): 77-89.
- C. Muñoz-Agudo, B. Díez-Cabezas, J.J. Bravo-Cordero, M. Casanova, C. Boullosa, **M.C. Guadamillas**, I. Ezkurdi, A. Valencia, D. Gonzalez-Pisano, M.A. del Pozo and M.C. Montoya. **“Rab8-mediated Rho GTPase activity and Focal Adhesion Turnover regulates Directional Cell Migration”**. (in preparation).

